

Université de Sherbrooke

Réplication des télomères humanisés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

par

Amadou BAH

Département de Microbiologie et d'Infectiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de
philosophiae doctor (Ph.D) en Microbiologie

10 juin 2009

Devant la commission d'examen formée de :

Professeur Éric GILSON, LBMC, ENS Lyon
Docteur Stéphane MARCAND, iRMC, CEA Fontenay
Docteur Antonin MORILLON, CGM, Université Paris-VI
Docteur Étienne SCHWOB, IGMM, Université Montpellier II
Professeur Raymund WELLINGER, Microbiologie



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-62830-0
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-62830-0

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

Table des Matières	I
Liste des Illustrations.....	VI
Liste des Sigles, Abréviations et Symboles	IX
Résumé	
INTRODUCTION	1
Organisation structurale des télomères	2
Fonctions des télomères.....	7
Fonction de protection et accès aux télomères	7
Réplication complète des chromosomes.....	17
La télomérase	21
La télomérase chez l'humain.....	22
La composante catalytique humaine : hTERT	22
La composante ARN humaine : hTR.....	24
Régulation de l'activité télomérase	25
Mécanisme d'action de la télomérase.....	26
Reconstitution de l'activité télomérase humaine.....	27
La télomérase chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
Maintien des télomères en absence de télomérase	32
Mutations dans la région matrice de <i>TLC1</i>	33
Régulation de la longueur des télomères chez <i>S. cerevisiae</i>	35
Objectifs.....	39

CHAPITRE I : Humanisation des télomères chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et

activation des points de contrôle 41

PRÉAMBULE 41

MATÉRIEL ET MÉTHODES 41

Souches utilisées..... 41

Test de viabilité cellulaire 42

Extraction d'ADN, détection de l'ADN télomérique 43

Manipulations levures 43

Préparation des extraits totaux de protéines..... 43

Immunobuvardage de type Western..... 44

Cycle cellulaire par FACS..... 45

Clonage et séquençage des télomères 45

RÉSULTATS 46

Organisation structurale des télomères chez la levure humanisée..... 47

Activation des points de contrôle chez la levure humanisée 50

Diminution de la viabilité cellulaire chez la levure humanisée..... 52

Les répétitions télomériques humaines distales sont responsables de l'activation des points de contrôle..... 54

CHAPITRE II : Instabilité génomique chez la levure humanisée 61

PRÉAMBULE 61

MATÉRIEL ET MÉTHODES 61

Souches utilisées..... 61

Sondes utilisées 62

Amplification des fusions télomère-télomère 62

Clonage et séquençage des fusions télomère-télomère 63

Gel d'électrophorèse à champs pulsés (CHEF gel)..... 64

RÉSULTATS	65
Les levures humanisées aux générations 2000 et 2500 acquièrent des fusions télomère-télomère	65
La méthode PCR révèle des fusions télomère-télomère chez la levure humanisée aussitôt que 1000 Gén.	67
Réarrangements chromosomiques chez les levures humanisées aux générations 1000 et plus.	70
 CHAPITRE III : Rôle de la télomérase dans la réplication des télomères humanisés	73
 PRÉAMBULE	73
MATÉRIEL ET MÉTHODES	74
Souches utilisées.....	74
Plasmides utilisés.....	74
Oligonucléotides utilisés.....	75
Construction de la souche <i>g2tetO₂-tlc1h</i>	75
Remplacement des gènes par natMX4.....	76
Test de viabilité et buvardage de type Southern.....	77
Gel à deux dimensions.....	77
RÉSULTATS	77
Phénotypes associés à la perturbation de la télomérase chez la levure humanisée.	77
L'abolition de l'expression de la composante ARN de la télomérase (<i>tlc1h</i>) est létale chez la levure humanisée.	78
L'abolition de l'activité catalytique de la télomérase (<i>est2D670A</i>) est létale chez la levure humanisée.....	80
Le déplacement du complexe télomérase de la fin des chromosomes est létal chez la levure humanisée.....	84
Réplication des télomères chez la levure humanisée.....	86
Pauses aux fourches de réplication des télomères humanisés.....	86

L'absence de certains gènes impliqués dans la réplication de l'ADN ou la recombinaison homologue confirme les défauts de réplication au niveau des télomères humanisés.	90
--	----

CHAPITRE IV : Expression d'une télomérase humaine fonctionnelle chez la levure humanisée.. 93

PRÉAMBULE	93
MATÉRIEL ET MÉTHODES	94
Souches utilisées.....	94
Plasmides utilisés.....	94
Essai de complémentation	94
RÉSULTATS	95
DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS	100

Des levures avec des télomères humains : vers une explication de l'évolution des télomères.....	100
Protéines associées aux télomères de levures humanisées, régulation de la longueur des télomères et instabilité génomique	102
Les séquences télomériques humaines reconnues comme un dommage par la cellule.	106
Le nouveau rôle essentiel de la télomérase chez la levure humanisée révélateur d'un problème de réplication	108
Expression d'une télomérase humaine fonctionnelle chez la levure	112

REMERCIEMENTS..... 115

LISTE DES RÉFÉRENCES..... 116

ANNEXES 138

Annexe 1 : 138

Bah, A., Bachand, F., Clair, E., Autexier, C. and Wellinger, R.J. (2004) Humanized telomeres and an attempt to express a functional human telomerase in yeast. *Nucleic Acids Res*, 32, 1917-1927.

Annexe 2 : 166

Chromatogrammes des résultats de séquençage de fusions télomère-télomère de la figure 21

Annexe 3 : 169

Carte de la fin des chromosomes chez *Saccharomyces cerevisiae*

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Tableau 1 : nature des répétitions télomériques chez différents organismes

Tableau 2 : séquence matrice de la composante ARN de la télomérase chez différents organismes

Tableau 3 : sondes utilisées dans le chapitre II

Tableau 4 : souches utilisées dans le chapitre III

Tableau 5 : plasmides utilisés dans le chapitre III

Tableau 6 : oligonucléotides utilisés dans le chapitre III

Tableau 7 : viabilité des levures sauvages et humanisées dans différents contextes génétiques et différentes conditions de croissance

Tableau 8 : plasmides utilisés dans le chapitre IV

Figure 1 : organisation structurale des télomères chez *S. cerevisiae*

Figure 2 : organisation structurale des télomères chez les mammifères

Figure 3 : conformation des télomères chez l'humain et la levure

Figure 4 : mécanisme de NHEJ chez la levure

Figure 5 : réplication de la fin des chromosomes : le problème du brin avancé

Figure 6 : homologie entre les domaines TERT humain et levure

Figure 7 : mécanisme d'action de la télomérase

Figure 8 : sénescence répllicative chez la levure

Figure 9 : protection de la fin des chromosomes chez *S. cerevisiae*

Figure 10 : organisation structurale des télomères chez la levure humanisée

Figure 11 : séquençage d'un télomère de levure humanisée

Figure 12 : cycle cellulaire chez la levure humanisée

Figure 13 : l'humanisation graduelle des télomères diminue la viabilité cellulaire

Figure 14 : activation de Rad53p chez les levures humanisées aux générations avancées

Figure 15 : structure des télomères de levures humanisées «levurisées»

Figure 16 : exemple de résultats de séquençages d'un télomère d'une levure humanisée à 500 et 1000 Gén. «levurisée»

Figure 17 : le simple brin télomérique humain activerait Rad53p

Figure 18 : rétablissement du cycle cellulaire chez la levure humanisée «levurisée»

Figure 19 : visualisation directe sur gel des fusions télomère-télomère chez les levures humanisées

Figure 20 : fusions télomère-télomère chez les levures humanisées aux générations avancées.

Figure 21 : des répétitions télomériques levures et humaines sont engagées à la jonction des fusions télomère-télomère.

Figure 22 : réarrangements chromosomiques chez les levures humanisées aux générations 1000 et plus.

Figure 23 : l'abolition de l'expression de *tlc1h* est létale chez la levure humanisée

Figure 24 : l'expression du mutant catalytique *est2D670A* est létale chez la levure humanisée

Figure 25 : longueur des télomères chez les levures sauvages (WT) et humanisées (HY) exprimant différentes versions de EST2

Figure 26 : la surexpression de Pif1p est létale chez les cellules γ Ku80 Δ et humanisées

Figure 27 : analyse des intermédiaires de réplifications de télomères par gel à deux dimensions

Figure 28 : augmentation des pauses de réplication au niveau des télomères humanisés

Figure 29 : viabilité des levures sauvages et humanisées dans différents contextes génétiques et différentes conditions de croissance

Figure 30 : l'expression des composantes humaines de la télomérase ne complémente pas l'absence de télomérase de levure (*tlc1h* Δ) dans une levure humanisée

Figure 31 : chromatine télomérique chez différentes souches de levures

Figure 32 : propagation du signal de dommage chez la levure *S. cerevisiae*

LISTE DES SIGLES, ABRÉVIATIONS et SYMBOLES

2D	deux dimensions
2μ	deux microns
ADN	acide désoxyribonucléique
ALT	alternative lengthening of telomeres – allongement alternatif des télomères
ARN	acide ribonucléique
ARS	autonomously replicating sequence – élément de séquence qui se réplique de façon autonome
BET	Bromure d'Éthidium
CEN	centromère
CHEF	Contour-clamped homogeneous electric field – électrophorèse à champs pulsés
ChIPs	immunoprécipitations de la chromatine
Chr. V-R	chromosome V droit
DBD	DNA binding domain – domaine de liaison à l'ADN
D-loop	displacement loop
ds ou db	double stranded – contrôle double brin
DSB	double strand break – bris ADN double brin
EN	enveloppe nucléaire
FOA	5-fluoroorotic acid
Gal	galactose
GAL1	promoteur inductible au galactose
Gén.	générations
Glc	glucose
HIS	histidine
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein

hTERT	human telomerase reverse transcriptase – sous-unité protéique de la télomérase humaine à activité transcriptase inverse
hTR	human telomerase RNA – sous-unité ARN de la télomérase humaine
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
Kpb	kilopaires de bases
LEU	leucine
LYS	lysine
NHEJ	non homologous end joining – réparation par jonction d’extrémités d’ADN non-homologues
nt	nucléotide
pb	paire de base
RNP	ribonucléoprotéine
RRL	lysate de réticulocytes de lapin
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
snoRNA	small nucleolar ribonucleoprotein
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
ss ou sb	single stranded : contrôle simple brin
STARs	sub-telomeric anti-silencing regions
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
t loop	telomere loop – boucle formée au télomère
TPE	telomere position effect – effet positionnel du télomère
TRD	telomere rapid deletion
TRFs	fragments terminaux de restriction
TRP	tryptophane
T-T	fusion télomère-télomère
URA	uracile
YC ou SC	synthetic complete – milieu synthétique
YPD ou YEPD	yeast extract peptone dextrose – milieu complet
WT	wild type – de type sauvage

Université de Sherbrooke

Réplication des télomères humanisés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Par

Amadou BAH

Département de Microbiologie et d'Infectiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

en vue de l'obtention du grade de
philosophiae doctor (Ph.D) en Microbiologie

10 juin 2009

Des cellules de levures dont les chromosomes se finissent par des répétitions télomériques humaines, peuvent être conçues en remplaçant simplement la séquence matrice ARN originale de la télomérase (*TLC1*) par une séquence matrice humaine (*tlc1h*). Dans ces levures dites « humanisées », les télomères sont courts mais stable avec une extension télomérique humaine 3' simple brin. Néanmoins, ces séquences humaines inhabituelles au niveau des télomères de *Saccharomyces cerevisiae* engendrent différentes réponses cellulaires. Après la substitution initiale de la séquence matrice de *TLC1*, les répétitions télomériques levures sont graduellement remplacées par les répétitions humaines qui sont reconnues comme un dommage par la cellule : la protéine Rad53p est phosphorylée. Cette activation de Rad53p est synonyme d'activation des points de contrôle du cycle cellulaire et en effet un délai en phase G2/M du cycle cellulaire est observé. L'accumulation en G2/M augmente avec le degré d'humanisation des télomères, et le phénotype terminal observé aux générations les plus avancées est un réarrangement chromosomique suite aux fusions entre télomères. La

réintroduction d'une copie originale de *TLC1* comme unique matrice ARN dans une levure qui était précédemment humanisée montrerait que le bloc télomérique humain distal, et plus précisément le simple brin télomérique humain T_2AG_3 , serait le signal responsable de la phosphorylation de Rad53p, tandis qu'un bloc $[T_2AG_3/C_3TA_2]$ à un site interne ne déclenche ni l'activation de Rad53p, ni les points de contrôle du cycle cellulaire. Tandis que les phénotypes associés à l'activation des points de contrôles du cycle cellulaire n'apparaissent seulement qu'aux générations avancées, la télomérase devient essentielle aussitôt que la cellule de levure contient *tlc1h* comme matrice ARN unique. L'abolition de l'expression de *tlc1h* ou l'expression d'un mutant catalytique de la télomérase mène à une perte immédiate de la viabilité sans sénescence. Cela suggère une augmentation dramatique de la fréquence des événements de raccourcissements critiques des télomères qui doivent être surmontés par une télomérase active. Nous nous sommes dès lors demandé si les répétitions télomériques humaines causaient des problèmes pour la machinerie de réplication de l'ADN chez la levure. En effet, les analyses de gel à deux dimensions ont révélé des intermédiaires de réplication non conventionnels indiquant qu'un télomère humanisé cause une pause au niveau de la fourche de réplication. En accord avec cette observation, la mutation de certains gènes impliqués dans la stabilité ou la progression des fourches cause une augmentation de la sensibilité des levures humanisées aux agents endommagent l'ADN. Ces derniers résultats expliqueraient le rôle obligatoire de la télomérase chez la levure humanisée qui viendrait compenser la perte des répétitions télomériques suite à la pause voire l'écroulement de la fourche de réplication.

Mots clés : télomères, télomérase, réplication, levure, cancer

INTRODUCTION

Télomère, dont l'origine grecque est « telos » fin et « meros » partie, est un terme défini pour la première fois par le généticien Hermann J. Muller à la fin des années 1930s et requiert toujours toute l'attention du monde scientifique en ce nouveau millénaire. En utilisant *Drosophila melanogaster* comme modèle d'étude, il observa après irradiations aux rayons X que les chromosomes étaient sujets à des cassures menant à des réarrangements chromosomiques (inversions, délétions et translocations) à l'exception des extrémités terminales qui étaient exemptes de telles modifications. Il réalisa ainsi que la stabilité des chromosomes était dépendante d'une structure terminale particulière (Muller 1938). Barbara McClintock confirma les résultats de Muller en proposant qu'une structure amenant la stabilité aux extrémités doit distinguer un chromosome brisé d'un chromosome naturel, concept basé sur l'observation que les chromosomes brisés de *Zea mays* pouvaient fusionner entre eux alors que les fins naturelles des chromosomes étaient assez stables (McClintock 1939, 1941). De nos jours les télomères sont définis comme les structures protectrices présentent aux extrémités des chromosomes eucaryotes linéaires, et sont composés d'unités répétitives d'ADN associées à de l'ARN télomérique et de protéines spécialisées.

Organisation structurale des télomères

En général, la séquence et l'organisation des télomères est extrêmement conservée chez tous les eucaryotes et peut se diviser en deux domaines structural et fonctionnel : la région sous-télomérique et la région télomérique proprement dite. La première séquence télomérique a été caractérisée chez le cilié *Tetrahymena thermophila* et consiste en la séquence T_2G_4/C_4A_2 répétée des dizaines de fois (Blackburn et Gall 1978). Depuis, les séquences télomériques de différents organismes ont été caractérisées et dans la majorité des cas l'ADN télomérique consiste en des séquences courtes répétées en tandem (Blackburn et Greider, 1995) (tableau 1). Cet ADN est en grande partie sous forme double brin et est polarisé de façon à ce que le brin riche en résidus guanines (G) constitue le brin G-riche orienté de 5' en 3' alors que le brin complémentaire riche en résidus cytosine (C) constitue le brin C-riche orienté de 3' en 5'. Une extension du brin riche en G par rapport au brin riche en C constitue toujours l'extrémité 3' simple brin des chromosomes (figures 1 et 2) et est essentielle pour l'élongation des répétitions riches en G par la télomérase (discuté plus loin). Des organismes éloignés phylogéniquement peuvent avoir la même séquence télomérique, T_2AG_3 chez le Trypanosome et tous les vertébrés, et dans d'autres cas, différents organismes appartenant à une même famille, *Tetrahymena* et *Oxytricha* chez les ciliés, peuvent avoir des séquences télomériques différentes mais celles-ci sont clairement reliées (tableau 1). Le nombre de répétitions aux extrémités chromosomales varie extrêmement entre différents organismes, entre différents télomères d'un même organisme et à l'intérieur d'une même cellule. Chez les mammifères, l'unité télomérique est composée des 6 nucléotides TTAGGG.

Organisme	Séquence	Référence
Ciliés		
<i>Tetrahymena</i>	T ₂ G ₄	(Blackburn et Gall 1978)
<i>Oxytricha</i>	T ₄ G ₄	(Klobutcher et al. 1981)
<i>Euplotes</i>	T ₄ G ₄	(Klobutcher et al. 1981)
Flagellés		
<i>Trypanosoma</i>	T ₂ AG ₃	(Blackburn et Challoner 1984)
Sporozoaires		
<i>Plasmodium</i>	T ₂ [T/C]AG ₃	(Ponzi et al. 1985)
Champignons		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T(G) ₂₋₃ (TG) ₁₋₆	(Shampay et al. 1984)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	T ₂ AC(A)G ₂₋₅	(Sugawara et Szostak 1986)
<i>Candida albicans</i>	ACGGATGTCTAACTTCTTGGTGT	(McEachern et Hicks 1993)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	ACGGATTGATTAGGTATGTGGTGT	(McEachern et Blackburn 1994)
Nématodes		
<i>Caenorhabditis elegans</i>	T ₂ AG ₂ C	(Cangiano et La Volpe 1993)
Plantes		
<i>Arabidopsis</i>	T ₃ AG ₃	(Richards et Ausubel 1988)
Vertébrés		
<i>Homo sapiens</i>	T ₂ AG ₃	(Moyzis et al. 1988)
<i>Mus spp.</i>	T ₂ AG ₃	(Kipling et Cooke 1990)
<i>Autres vertébrés</i>	T ₂ AG ₃	(Meyne et al. 1989)

Tableau 1 : nature des répétitions télomériques chez différents organismes (adapté de Henderson, 1995)

Cette séquence, commune à tous les vertébrés, est répétée en tandem des milliers de fois : chez l'humain le duplex ADN [T₂AG₃/C₃TA₂] est d'environ 5-15 kpb alors que chez la souris celui-ci peut atteindre jusqu'à plus de 100 kpb quelque soit la phase du cycle cellulaire (de Lange et al. 1990, Kipling et Cooke 1990, Starling et al. 1990). Concernant les extensions humaines riches en G, celles-ci sont d'environ 75-300 bases à travers le cycle cellulaire (figure 2) (McElligott et Wellinger, 1997; Makarov et al., 1997). Contrairement aux cellules de mammifères, les répétitions télomériques chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont constituées d'une séquence irrégulière T(G)₂₋₃(TG)₁₋₆, communément abrégée TG₁₋₃, et répétée

une centaine de fois pour former un télomère d'environ 300 pb (Shampay et al., 1984). Ces cellules acquièrent une courte extension riche en G supérieure ou égale à 30 bases en fin de phase S (Wellinger et al., 1993b). Dans les autres phases du cycle cellulaire cette extension est de 10-15 nt (Larrivée et al. 2004).

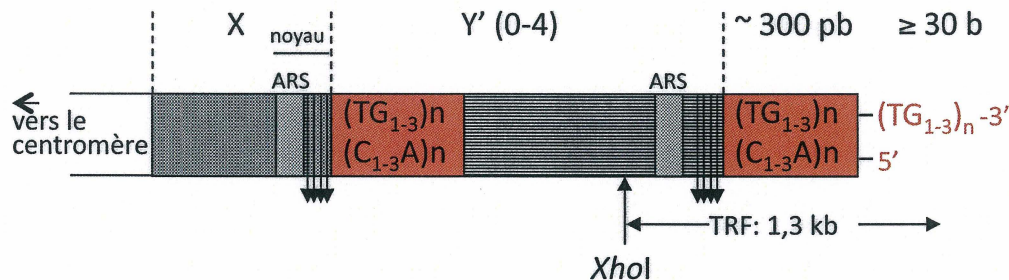


Figure 1 : organisation structurale des télomères chez *S. cerevisiae*

Chaque chromosome commence et fini par des répétitions $C_{1-3}A/TG_{1-3}$ dont la longueur est d'environ 300 pb. Une courte extension TG_{1-3} qui peut atteindre plus de 30 bases en fin de phase S constitue la fin du chromosome (Wellinger et al. 1993). Environ les 2/3 des télomères comportent 0 à 4 copie de l'élément Y' d'une longueur de 6,7 ou 5,2 kb (Chan et Tye, 1983). Plus à l'interne on retrouve l'élément X, (0,3 à 3 kb) dont la séquence est hétérogène, présent sur la plupart des télomères. Des répétitions internes $C_{1-3}A/TG_{1-3}$ sont fréquemment trouvées entre les Y' ou entre X et Y' (Walmsley et al. 1984). Des répétitions humaines C_3TA_2/T_2AG_3 ou de type T_2AG_3 constituent également les télomères de levure, représentées ici par les flèches verticales dirigées vers le bas. La jonction entre le noyau X, qui contient les répétitions TTAGGG dégénérées et un ARS (Flint et al. 1997), et l'élément Y' est très variable et contient un certain nombre de répétitions humaines. Séquence sous-télomérique distale: Y', séquence sous-télomérique proximale: après noyau X. L'endonucléase *XhoI* permet d'apprécier la longueur des TRFs en coupant une seule fois dans l'élément Y', générant ainsi un patron de bandes caractéristique sur gel de télomère (Louis et Haber, 1990). Adapté de Zakian, 1995.

En direction du centromère on retrouve la région sous-télomérique adjacente aux répétitions télomériques. Chez *S. cerevisiae*, cette région est représentée par les éléments X et Y' (Chan et Tye, 1983) (figure 1 et annexe 3) alors que chez l'humain elle consiste en des séquences dégénérées TTAGGG ainsi que des séquences non-télomériques (figure 2).

L'élément X, de 0,3 à 3,75 kb est moins conservé que l'élément Y' (Chan et Tye, 1983; Zakian et Blanton, 1988; Biessmann et Mason, 1992). La seule région partagée par tous les

chromosomes est un petit élément de 475 pb, nommé noyau X, qui contient un élément de séquence qui se réplique de façon autonome ARS (Louis 1995) et les sites de liaison de deux protéines essentielles, Tbf1p et Abf1p (Liu et Tye 1991; Brand et al, 1987). L'élément Y', hautement conservé, est présent jusqu'à 4 copies en tandem sur les deux tiers des télomères et correspond à deux tailles majeures de 5,2 et 6,7 kpb. Des événements fréquents de recombinaisons homologues et de conversions géniques ont été documentés entre les éléments Y' qui jouent un rôle dans la diffusion et la variabilité de ces séquences sous-télomériques de levure (Louis et Haber, 1990; Louis et Haber, 1992; Louis et Haber, 1990). Le haut degré de recombinaison entre les éléments Y' résulte en un polymorphisme des télomères et est suffisant pour maintenir la fonction des télomères et la viabilité cellulaire lorsqu'un défaut dans la réplication des télomères par la voie de la télomérase est observé (Lundblad et Blackburn, 1993).

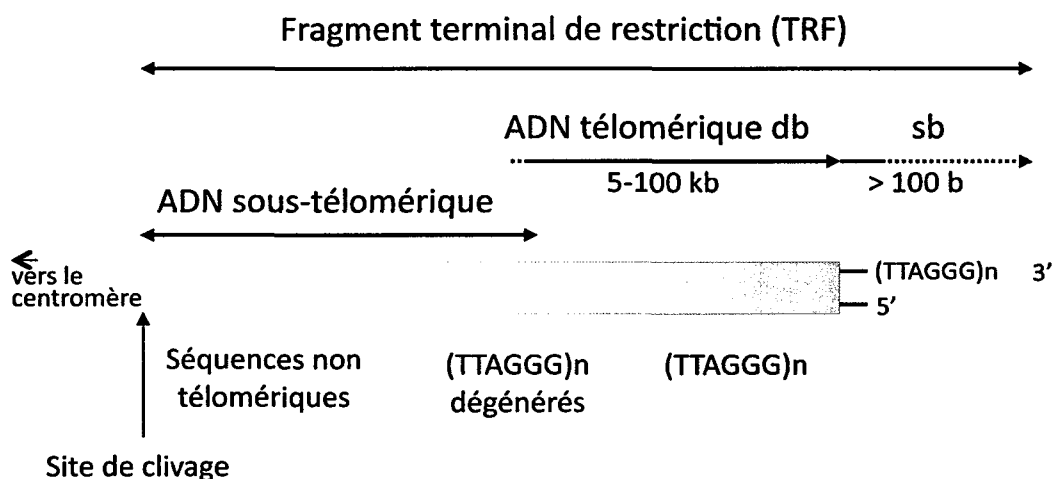


Figure 2 : organisation structurale des télomères chez les mammifères

La digestion de l'ADN génomique avec des enzymes coupant fréquemment dans le génome (*HinfI* + *RsaI*) va libérer des TRFs (Fragments terminal de restriction) comprenant la région télomérique constitué de répétitions parfaites TTAGGG, une région sous-télomérique contenant des répétitions dégénérées TTAGGG parsemé de répétitions parfaites et de séquences simples sans rapport. Adapté de Bacchetti, 1996.

Les répétitions irrégulières [TG₁₋₃/CA₁₋₃] sont trouvées entre les éléments Y' et séparent les éléments X et Y', ce qui démontre que la séquence en elle seule ne constitue pas un télomère. À la jonction entre les éléments X-Y' et les répétitions TG₁₋₃ se trouvent des séquences apparentées aux répétitions télomériques humaines (TTAGGG)_n où au moins une répétition est parfaite. Cette séquence retrouvée chez plusieurs organismes dont tous les vertébrés, est aussi le site de liaison de la protéine Tbf1p. Cette protéine lie les copies TTAGGG adjacentes aux éléments X et sûrement les copies adjacentes aux Y' (Brigati et al., 1993). Les répétitions internes de type TTAGGG et l'élément ARS constitueraient une frontière aux échanges de séquences entre les domaines sous-télomériques distaux et proximaux de levure (Flint et al. 1997). En effet, l'élément X est une barrière à la recombinaison car la délétion de cet élément résulte en une augmentation de l'échange entre les séquences sous-télomériques proximales et distales (Flint et al. 1997). Une étude comparative entre les télomères humains et de levures a montré que la structure générale des régions sous-télomériques de levure ressemble étroitement aux séquences sous-télomériques humaines (Flint et al. 1997). Les fonctions des régions sous-télomériques restent encore inconnues mais un chromosome de levure sans régions sous-télomériques peut se répliquer, ségréger et recombiner en mitose et méiose aussi bien qu'un télomère pourvu de cette région. Donc leur présence n'est pas nécessaire pour la fonction des télomères. Néanmoins, les régions sous-télomériques semblent interagir de façon fonctionnelle avec les télomères pour étendre et consolider les fonctions essentielles des extrémités des chromosomes (Fourel et al, 1999).

Fonctions des télomères

La fonction essentielle des télomères est la préservation de l'intégrité des génomes eucaryotes (Zakian, 1989). En effet, ils distinguent les extrémités chromosomales des bris ADN double brin et préviennent ainsi leurs dégradations et leurs fusions bout à bout (Zakian, 1989; Pardo et Marcand, 2005). Ils participent aussi dans le couplage et le mouvement des chromosomes à la mitose et à la méiose assurant ainsi une préservation des chromosomes à chaque division cellulaire (Chikashige et al., 1994; Dernburg et al., 1996).

Fonction de protection et accès aux télomères

Chez la levure *S. cerevisiae* ou l'humain, la plus grande partie de l'ADN télomérique (région sous-télomérique) est agencée en nucléosomes résistants aux méthylases et seulement la partie la plus distale (répétitions télomériques) est sous une conformation de chromatine non-nucléosomale nommée télosome résistantes aux nucléases (Wright et al. 1992; Tommerup et al. 1994; Lejnine et al. 1995) (figure 9).

La chromatine télomérique est constituée de protéines spécialisées que l'on peut classer en trois groupes : les protéines liant la partie double brin de l'ADN télomérique, les protéines recrutées aux télomères par le biais d'interactions protéine-protéine et finalement les protéines liant l'extension terminale riche en G. Toutes ces protéines jouent un rôle dans l'homéostasie des télomères et dans l'accès de la télomérase au substrat télomérique.

Rap1p chez la levure *S. cerevisiae* (Conrad et al., 1990), TRF1 et TRF2 chez l'humain (Chong et al. 1995; Broccoli et al., 1997) et Taz1p chez *Schizosaccharomyces pombe* (Cooper et al., 1997) sont les protéines liant l'ADN double brin télomérique les mieux caractérisées.

Chez la levure *S. cerevisiae* **Rap1** (repressor activator protein 1) est la protéine télomérique par excellence et joue un rôle central dans l'homéostasie des télomères. Cette protéine est impliquée dans la transcription de nombreux gènes chez la levure et a deux fonctions au niveau des télomères : la régulation de la longueur des télomères (discuté plus loin) et la répression transcriptionnelle des gènes localisés près des télomères communément appelé TPE (Telomere position effect) (voir Tham et Zakian, 2002 pour une revue) (Gottschling et al., 1990). Rap1p lie spécifiquement le duplex $TG_{1-3}/C_{1-3}A$ par l'intermédiaire de ces deux domaines de type Myb au centre de la protéine (Conrad et al. 1990; Wright et Zakian, 1995; Gilson et al., 1993, König et al., 1996). Ce domaine de liaison à l'ADN est hautement conservé et composé de répétitions en tandem du motif hélice-tour-hélice. Rap1p joue un rôle négatif dans la régulation de la longueur des télomères en recrutant les protéines **Rif1** et **Rif2** (Rap1-interacting factors) en sa partie C-terminale (discuté plus loin) et serait également impliqué dans l'établissement et la maintenance du TPE en recrutant les protéines **Sir3** et **Sir4** par ce même domaine.

L'activité déacétylase de **Sir2p** permet la dissémination de la chromatine silencieuse aux nucléosomes avoisinants de la région sous-télomérique par la liaison des protéines Sir3 et Sir4 aux queues N-terminales des histones H3 et H4 hypoacétylés (Suka et al., 2002). Sir2p est également impliqué dans le silençage transcriptionnel aux locus *HML* et *HMR* du mating type par le même processus. L'hétérodimère Ku est aussi impliqué dans la dissémination des

protéines Sir en s'associant à Sir4p contrairement à son association aux extrémités chromosomales (discuté plus loin).

La délétion de certains gènes non essentiels comme *SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *HDF1* (yKu70) ou *HDF2* (yKu80) abolie quasiment le TPE tout comme la délétion de la partie C-terminale de Rap1p requise pour la liaison de Sir3p et Sir4p. Le TPE diminue aussi en fonction qu'on s'éloigne de l'extrémité télomérique ce qui corrèle avec une diminution de la concentration des protéines Sir. L'acétylation des histones constituerait la transition entre l'hétérochromatine et l'euchromatine (Suka et al., 2002). Chez les cellules de mammifères des évidences montrent la présence de TPE (Baur et al., 2001).

La nature hétérochromatique des télomères laissait suggérer que la transcription dans ces régions ne pouvait avoir lieu. Récemment il a été démontré que les télomères de mammifères étaient transcrits en ARN nommé TERRA, TElomeric Repeat-containing RNA, et cet ARN correspondant au brin G-riche était associé aux télomères (Azzalin et al., 2007; Schoeftner and Blasco, 2008). La fonction de ce nouvel élément au niveau de la biologie des télomères reste à être découvert.

Chez les cellules humaines, **TRF1** semble être l'homologue fonctionnel de Rap1p chez *S. cerevisiae*. TRF1 lie par son domaine de type Myb tout le long du duplex télomérique humain *in vitro* sous forme de dimères (domaine de dimérisation) (Chong et al., 1995; Bianchi et al., 1997; Bianchi et al., 1999) et régule négativement la longueur des télomères comme Rap1p (Ancelin et al., 2002). De plus, la surexpression de TRF1 résulte en la diminution graduelle des télomères alors que la surexpression d'une forme déficiente de TRF1 dans son domaine de

liaison enlève TRF1 endogène des télomères et conduit à une augmentation de la longueur des télomères (van Steensel et de Lange, 1997; Smogorzewska et al., 2000).

TRF2, tout comme TRF1, lie le duplex télomérique [T_2AG_3/C_3TA_2] et sa surexpression mène à une diminution de la longueur des télomères (Broccoli et al., 1997; Smogorzewska et al., 2000). La surexpression d'une version dominante négative de TRF2 résulte en la perte des molécules TRF2 liées aux télomères et mène à une perte des extensions riches en G simple brin et une augmentation dramatique des fusions bout à bout (van Steensel et al., 1998).

Des études de microscopie électronique supportent le modèle dans lequel les télomères de mammifères se replieraient sur eux-mêmes et formeraient des boucles à l'extrémité (figure 3) (Griffith et al. 1999). Dans une large boucle, l'extension riche en G simple brin forme une structure en lasso nommée t-loop (telomere-loop) en envahissant le duplex ADN. Ce repliement serait facilité par la liaison de TRF1 le long du duplex ADN. La taille des t-loops s'échelonne de 0.3 kpb chez les trypanosomes à plus de 30 kpb chez les cellules de souris (Griffith et al., 1999; Munoz-Jordan et al., 2001; Murti et Prescott, 1999). Le déplacement de cette extension simple brin induit son invasion à une région double brin homologue et sa liaison complémentaire à un des deux brins. Cette structure nommée D-loop (displacement-loop) est assurée par TRF2 dont la localisation est concentrée à cette jonction. La perte des extensions riches en G observée dans les cellules exprimant la forme dominante négative de TRF2 peut être la conséquence de la perte de t-loop. TRF2 joue donc un rôle crucial dans la protection terminale des télomères qui peut être essentielle pour la fonction de stabilité des télomères humains. Le rôle de cette architecture est de séquestrer l'extrémité 3' simple brin en créant une structure qui est distincte d'un ADN terminal brisé (de Lange, 2002). De cette façon,

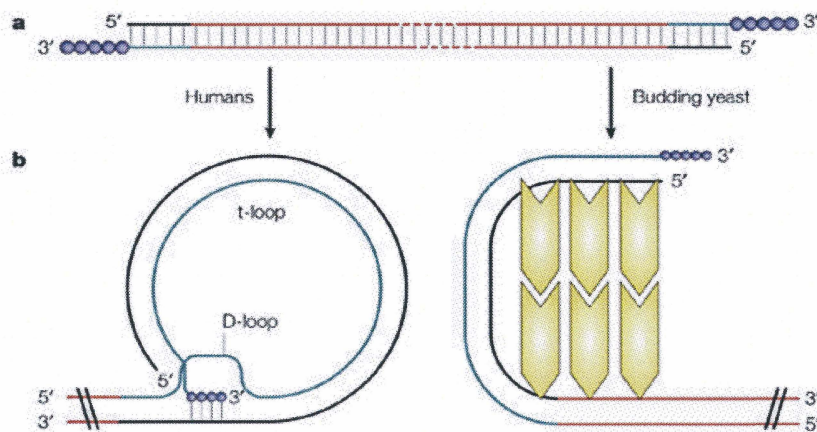


Figure 3 : conformation des télomères chez l'humain (A) et la levure (B).

Voir texte pour commentaires. Tiré de Vega et al. 2003.

l'extension riche en G reste inaccessible aux activités qui pourraient agir aux extrémités de l'ADN comme les points de contrôle de dommage à l'ADN, les enzymes de réparation de l'ADN et la télomérase

(Griffith et de Lange, 1999;

Greider, 1999). Bien que les t-loops n'aient pas été détectés chez la levure, les télomères de *S. cerevisiae* ont une organisation macromoléculaire différente où le télomère se replierait sur l'ADN sous-télomérique sans invasion de l'extension simple brin (figure 3) (Strahl-Bolsinger et al., 1997), courbure sûrement médiée par Rif1p et Rif2p qui lient Rap1p et les protéines Sir stabiliseraient la structure en liant à l'hétérodimère Ku, Rap1p, et les histones des nucléosomes (Dubois et al., 2000). En contraste avec les télomères de mammifère, la perte de la structure en boucle assurée par Rap1p chez la levure n'affecte pas le taux de perte des chromosomes, suggérant ainsi que le repliement des télomères chez la levure n'est pas essentiel pour la stabilité génomique (de Bruin et al., 2000).

Les protéines liant le duplex télomérique recrutent des protéines additionnelles qui sont requises pour la fonction normale des télomères (voir revue Palm et de Lange pour les mammifères).

L'hétérodimère Ku, hautement conservé, lie avec beaucoup d'affinité les extrémités double brin, indépendamment de leur séquence ou structure et joue un rôle crucial dans la réparation des bris ADN double brin via le NHEJ chez la levure et les mammifères (Jones et al. 2001) et protège les télomères de la recombinaison homologe. Suite à un dysfonctionnement

télomérique, des fusions

télomère-télomère peuvent

être générées par NHEJ

(Mieczkowski et al. 2003 ;

Pardo et Marcand, 2005 ;

Chan et al., 2003) dont le

processus requiert les

protéines Mre11, Rad50,

Xrs2, Yku70/80, Lig4, Lif1 and

Nej1 (revue dans Daley et al.,

2005) (figure 4).

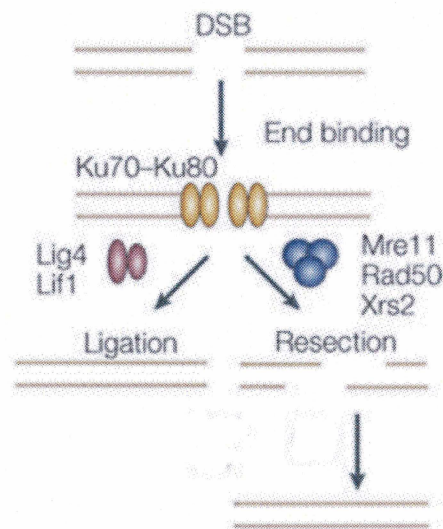


Figure 4: mécanisme de NHEJ chez la levure

Les extrémités des cassures ADN db sont détectées et liées par l'hétérodimère Ku70/Ku80, qui faciliterait la ligation bout-à-bout par le complexe Lig4/Lif1, assurant ainsi une réparation fidèle (voie à gauche). Dans une autre voie, la liaison de KU est suivie par la résection des extrémités libres par le complexe MRX, et la liaison des extensions ADN sb se ferait là où des régions de microhomologies existent. Dans ce cas la réparation des DSB est sujette à des erreurs (voie à droite). Pol4 interagit avec le complexe Lig4/Lif1. Adapté de van Attikum et Gasser, 2005.

Chez *S. cerevisiae*, **yKu70** et **yKu80** sont associés aux télomères *in vivo* (Gravel et al., 1998). Des cellules délétées pour Ku ont de multiples défauts au niveau des télomères notamment une réduction de leur longueur (Porter et al., 1996), de longues extensions riches en G simple brin (Gravel et al., 1998; Polotnianka et al., 1998), une expression altérée des gènes proximaux aux télomères (Gravel et al., 1998; Boulton et Jackson, 1996, Laroche et al., 1998) et une augmentation de la recombinaison télomère-télomère à température restrictive (Polotnianka et al., 1998). Ku interagit avec la tige boucle de la composante ARN de la

télomérase TLC1 (Stellwagen et al., 2003; Peterson et al., 2001) et la délétion de ce motif mène à une diminution de la longueur des télomères (Peterson et al., 2001). Dans une souche où Ku n'est plus capable de lier la tige boucle de TLC1 mais conserve sa liaison à l'ADN, la protection terminale des chromosomes et la réparation de l'ADN sont normales, mais l'addition des répétitions télomériques levures est compromise (Stellwagen et al., 2003). Donc yKu70/80 promouvoit l'accès de la télomérase aux télomères par son habilité à lier la tige boucle de TLC1 (Stellwagen et al., 2003; Peterson et al., 2001). Chez l'humain, l'hétérodimère **Ku70/86** est aussi associé aux télomères mais à travers l'interaction avec TRF1 (Hsu et al., 2000). De plus Ku humain interagit avec hTR (Ting et al., 2005), la composante ARN de la télomérase humaine, et immunoprécipite avec l'unité catalytique de la télomérase TERT (Chai et al., 2002). Ku aux télomères humains jouerait le rôle de protection et de maintien des télomères (Jaco et al., 2004, Fisher et Zakian, 2005).

La protéine **Tbf1p** (TTAGGG-repeat binding factor 1), essentielle pour la croissance mitotique, est capable de lier spécifiquement les répétitions télomériques humaines double brin des chromosomes de levure. En effet, des répétitions TTAGGG ou des versions permutées de cette séquence sont présentes à haute densité dans les portions proximales des éléments X et Y' qui séparent l'ADN télomérique des éléments sous-télomériques (figure 1). Ces régions sont liées par Tbf1p *in vitro* et *in vivo*. (Brigati et al. 1993; Liu et Tye, 1990; Fourel et al., 1999; Koering et al., 2000). Son domaine de liaison à l'ADN a des similarités avec celui de Taz1p chez *Schizosaccharomyces pombe*, TRF1 et TRF2 chez les vertébrés et leur haut degré de similarité les identifient comme les membres d'un groupe distinct des répétitions Myb, la famille « telobox » (Bilaud et al., 1996; Bilaud et al., 1997; Brun et al., 1997). D'après Koering et al.,

Tbf1p lie la séquence consensus « TAGGGTTAG », identique au site de liaison du domaine telobox de TRF1. Les domaines telobox de Tbf1p, TRF1, TRF2 et Taz1p montrent une haute affinité dans la liaison des répétitions de type TTAGGG *in vivo* mais pas pour les répétitions irrégulières TG₁₋₃ de *S. cerevisiae* (Bilaud et al., 1996; Vassetzky et al., 1999; Brun et al., 1997). Il a été démontré chez *S. cerevisiae*, où l'humanisation de la séquence matrice de *TLC1* permet l'ajout de répétitions télomériques humaines aux extrémités des chromosomes de levure, que Tbf1p pouvait lier les répétitions humaines terminales (Alexander et Zakian, 2003) et serait un régulateur négatif de la longueur des télomères (Berthiau et al., 2006). Entre autre, il a été proposé que Tbf1p jouerait un rôle aux télomères en neutralisant le TPE et plus généralement le silençage transcriptionnel médié par les protéines Sir. En effet, les régions sous-télomériques contenant les sites Tbf1p exhibent des activités de silençage nommées STARs (sub-telomeric anti-silencing regions) (Fourel et al., 1999). Lorsque lié à l'ADN, Tbf1p reconstituerait les activités STARs en bloquant la propagation de la chromatine silencieuse; ainsi les STARs formeraient des frontières pour limiter le TPE et/ou protégeraient les télomères de l'influence des éléments sous-télomériques (Fourel et al., 1999).

Les extrémités 3' sortantes des télomères de différents organismes sont liées spécifiquement par des protéines spécialisées comme Cdc13p chez *S. cerevisiae* et POT1 chez la levure de fission *S. pombe* et l'humain. Celles-ci jouent un rôle dans la protection terminale des télomères et contribuent à l'accès de la télomérase au substrat télomérique.

Cdc13p lie spécifiquement l'extrémité 3' simple brin TG₁₋₃ (Lin et Zakian, 1996; Nugent et al., 1996) à travers son domaine de liaison à l'ADN simple brin de haute affinité, et est localisé aux télomères *in vivo* (Bourns et al., 1998, Tzukamoto et al., 2001). Cette protéine a

aussi de l'affinité pour les séquences télomériques humaines simple brin *in vitro* bien que 10 fois plus faible par rapport aux répétitions TG₁₋₃ de levure (Lin et Zakian, 1996; Nugent et al., 1996, Alexander et Zakian, 2003). Cdc13p a pour fonction la protection terminale des chromosomes et est requis pour la réplication des télomères en tant que régulateur positif ou négatif de la télomérase en fournissant une plateforme protéique pour le recrutement d'autres complexes protéiques (Pennock et al., 2001). Sa fonction au sein de l'holoenzyme télomérase est discutée plus loin. La perte de fonction de *CDC13* dans une souche portant la mutation Cdc13-1 est accompagnée d'une dégradation immédiate et extensive du brin riche en C des télomères. Les longues extensions 3' simple brin qui en résultent activent le point de contrôle *RAD9* et induisent un arrêt dans la phase G2 du cycle cellulaire (Garvik et al., 1995). Ces résultats suggèrent que la liaison de Cdc13p aux extrémités protège les termini d'une dégradation non régulée. Cette activité de dégradation jouerait un rôle durant la réplication normale des télomères (Wellinger et al., 1996), en exposant une région simple brin et assurant ainsi un substrat pour la liaison de Cdc13p. Sachant que l'extension riche en G présente aux télomères de levure est supérieure ou égale à 30 nucléotides durant la phase S (Wellinger et al., 1993), il est possible que des complexes protéiques se forment sur l'extension télomérique simple brin, assurant les fonctions séparées de protection terminale et réplication. Également Cdc13p promouvoit la synthèse du brin riche en C en recrutant l'ADN polymérase α aux télomères (Qi et Zakian, 2000).

Stn1p « suppressor of *cdc* thirteen 1 » et **Ten1p** « protein involved in Telomeric pathways in association with Stn, number 1 », toutes deux interactives avec Cdc13p, seraient les effecteurs premiers de la protection terminale des chromosomes en assurant une activité

spécifique qui préviendrait la dégradation des extrémités chromosomales (Grandin et al., 2001; Grandin et al., 1997; Pennock et al., 2001).

La protéine liant le simple brin télomérique chez *Schizosaccharomyces pombe* est spPot1 ou « protection of telomeres », nom basé sur le fait que la délétion du gène *pot1+* mène à une dégradation rapide des télomères. Les survivants de cette perte de télomère ont des chromosomes circularisés qui ont perdu tout ADN télomérique : spPot1 est donc essentiel pour la protection des extrémités chromosomales (Baumann et Cech, 2001). Des orthologues chez la plante *Arabidopsis*, la souris et l'humain et d'autres eucaryotes ont été identifiés par similarité de séquence avec TEBP α d'*Oxytricha nova*, protéine associée à l'extension simple brin dans cet organisme (Baumann et Cech, 2001).

hPot1 a deux domaines importants requis pour sa fonction : un domaine N-terminal OB-fold (oligonucleotide- and oligosaccharide-binding fold) pour la liaison à l'ADN simple brin (Baumann et Cech, 2001; Mitton-Fry et al., 2002), et un domaine d'interaction protéique qui permet sa localisation aux télomères en s'associant avec le complexe TRF1 (Loayza et de Lange, 2003). L'association de POT1 aux télomères est supportée par sa colocalisation avec TRF2 et RAP1 (Baumann et al., 2002). POT1 est donc un bon candidat pour fournir un lien entre TRF1 sur le duplex télomérique et l'extension 3' où la télomérase agit. hPOT1 lie uniquement les répétitions télomériques humaines simple brin TTAGGG. La surexpression d'une version mutante de POT1 déléetée en son domaine OB résulte en une élongation rapide des télomères (Loayza et de Lange, 2003). Ces observations impliquent que POT1, en concert avec TRF1, inhibe la longueur des télomères en limitant l'accessibilité des télomères à la télomérase. En

contraste, une autre étude montre que la surexpression de POT1 résulte en une augmentation de la longueur des télomères dépendante de la télomérase, ce qui suggère que POT1 est un régulateur positif de la télomérase (Colgin, 2003). TPP1 en s'associant avec POT1 forme un complexe au niveau des télomères qui va augmenter la processivité de la télomérase humaine (Wang et al., 2007; Xin et al., 2007).

Réplication complète des chromosomes

La réplication des chromosomes pose un problème spécial pour les cellules. Les polymérases à ADN conventionnelles utilisent une amorce ARN pour initier la synthèse de l'ADN de 5' en 3'. Après la dégradation de la dernière amorce ARN, un trou de 8-12 bases est créé à l'extrémité 5' du brin retardé générant ainsi une courte extension riche en G potentiellement reconnue et liée par des protéines spécialisées. Sans un système pour remplir ce trou, il y aurait un raccourcissement inévitable des chromosomes à travers les étapes successives de réplication qui mènera à l'instabilité génomique voire la mort cellulaire due aux télomères trop courts pour continuer d'assurer leur fonction de protection terminale des chromosomes : c'est ce qui est communément appelé « the end replication problem » (Olovnikov, 1971; Watson, 1972). Néanmoins, cette théorie de longue date était erronée, ou du moins le réel problème a mal été identifié. En effet, le problème ne se situe pas au niveau de la réplication du brin retardé mais au contraire au niveau du brin avancé (Lingner et al., 1995).

L'extrémité chromosomale qui est générée par la polymérase du brin retardé finira en une courte extension riche en G due à l'enlèvement de la dernière amorce ARN : cette

extension riche en G est le substrat idéal pour la télomérase; alors que pour le brin avancé, l'extrémité sera franche, dépourvu donc d'extension riche en G. Cependant, la télomérase a besoin d'une courte extension riche en G simple brin pour allonger les télomères.

Chez la levure, les extensions riches en G sont probablement générées par une dégradation (exonucléase 5' → 3') régulée du brin riche en C en fonction du cycle cellulaire (Wellinger et al., 1993a; Wellinger et al., 1993b; Wellinger et al., 1996). Finalement, la synthèse du brin riche en C par la machinerie de réplication conventionnelle a lieu de façon concomitante avec, ou peu de temps après, l'élongation de l'extension riche en G par la télomérase (Diede et Gottschling, 1999, Adams Martin et al., 2000). Les chromosomes des cellules eucaryotes sont ainsi complètement répliqués grâce à la participation de la télomérase (figure 5).

Sans télomérase on observe une érosion répllicative à l'extrémité des deux chromatides, mais la voie de recombinaison homologue (Lundblad et Blackburn, 1993; Le et al., 1999; Teng et Zakian, 1999) (discuté plus loin) serait une autre alternative pour maintenir les télomères et ainsi assurer la réplication complète de la fin des chromosomes.

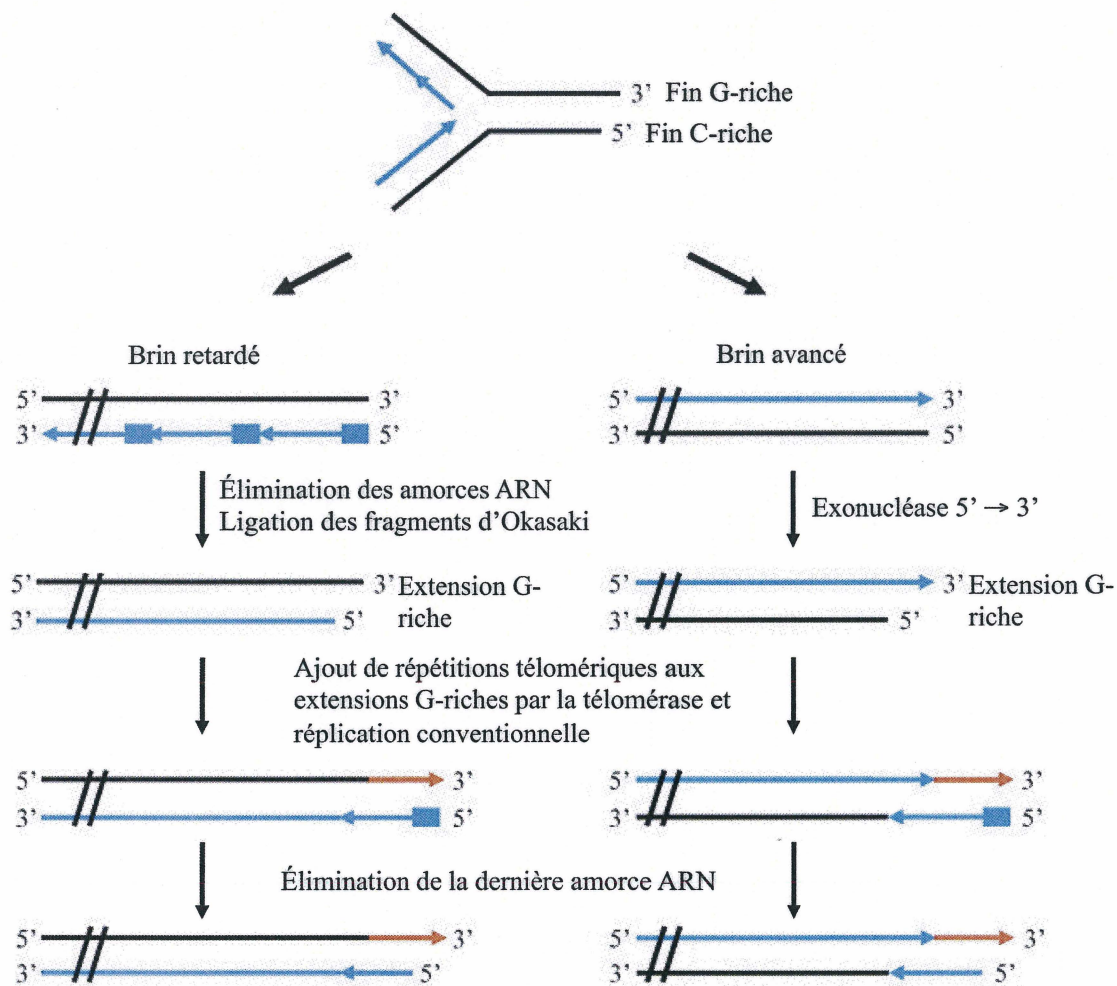


Figure 5 : réplication de la fin des chromosomes: le problème du brin avancé
 L'ADN néosynthétisé est représenté en bleu, l'ADN parental en noir, l'ajout de répétitions télomériques par la télomérase en rouge. Voir texte pour commentaires.
 Adapté de Viscardi et al., 2005.

Comme illustré à la figure 1 et d'après l'analyse du génome de la levure *Saccharomyces cerevisiae* par séquençage (annexe 3), adjacent aux répétitions télomériques terminales on retrouve l'élément sous-télomérique X pour 15 télomères et l'élément sous-

télomérique Y' pour les 17 autres télomères. Chacune de ces régions sous-télomériques comprennent un élément de séquence qui se réplique de façon autonome (ARS) et qui joue le rôle de dernière origine de réplication. Les ARS des éléments X sont très peu efficaces voire inactifs sur la plupart des «télomères X», dès lors l'origine de réplication utilisée pour initier la réplication d'un «télomère X» est le premier ARS actif en partant des répétitions télomériques terminales (Newlon et al. 1993 ; Poloumienko et al., 2001). Les ARS des éléments Y' sont actifs sur la plupart des «télomères Y'» (Ferguson et al. 1991; Stevenson et Gottschling, 1999 ; Ivessa et al., 2002 ; Makovets et al., 2004 ; revue dans Gilson et Géli, 2007). Chez la levure sauvage, la réplication des télomères a lieu en fin de phase S (McCarroll et Fangman 1988 ; Ferguson et al. 1991 ; Wellinger et al. 1993a), tout comme l'élongation des télomères par la télomérase (Marcand et al., 2000), due à l'allumage tardif des origines de réplication sous-télomériques. Chez les cellules de levure ayant des télomères courts, la réplication des télomères a lieu en début de phase S due à l'allumage précoce des origines de réplication (Bianchi et Shore, 2007a), et l'association de la télomérase à ces télomères courts est augmentée (Bianchi et Shore, 2007b, revue dans Bianchi et Shore, 2008). Une configuration différente [télomères courts/télomères longs] de la chromatine télomérique qui exerce un effet de position (TPE) au niveau sous-télomérique serait responsable du timing de l'activation des ARS sous-télomériques (Gottschling et al., 1990; Ferguson et Fangman, 1992 ; Stevenson et al., 1999 ; Makovets et al., 2004).

Finalement, la progression des fourches de réplication est ralentie lorsque celles-ci rencontrent les complexes ADN-protéines présents au niveau des régions télomériques (Ivessa et al., 2002).

La télomérase

La télomérase est un complexe ribonucléoprotéique (RNP) constitué d'une protéine à activité transcriptase inverse, d'une composante ARN fonctionnelle qui sert de matrice pour la synthèse de l'ADN télomérique à l'extrémité 3' des chromosomes, et de protéines associées à ces deux éléments. La fonction de ce complexe RNP est la synthèse *de novo* de l'ADN télomérique de façon à compenser la perte de séquence qui a lieu durant la réplication semi-conservative de l'ADN.

Depuis sa première découverte chez le cilié *Tetrahymena thermophila* (Greider et Blackburn, 1985), la télomérase a été identifiée chez différents organismes, notamment les mammifères, les plantes et la levure (tableau 2).

Organisme	Séquence télomérique (5' vers 3')	Séquence matrice ARN vers 5')	(3'	Longueur de l'ARN (nt)	Référence
<i>Tetrahymena</i>	TTGGGG	CAACCCCA		159	Greider et Blackburn, 1989
<i>Euplotes</i>	TTTTGGGG	CAAAACCCAAAACC		190	Shippen-Lentz et Blackburn, 1990
<i>Oxytricha</i>	TTTTGGGG	CAAAACCCAAAACC		190	Lingner et al. 1994; Melek et al. 1994
<i>Homo sapiens</i>	TTAGGG	CUAACCCUAC		451	Feng et al., 1995
<i>Mus spp.</i>	TTAGGG	CCUAACCCU		451	Blasco et al., 1995
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T(G) ₂₋₃ (TG) ₁₋₆	CACCACCCACACAC		~1300	Singer et Gottschling, 1994
<i>Kluyveromyces lactis</i>	ACGGATTGATT- AGGTATGTGGTGT	UCAAUCCGUACCAAUACC UAAUCAA		~1300	McEachern et Blackburn, 1994
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	T ₁₋₂ ACA ₀₋₁ C ₀₋₁ G ₁₋₆	augCCAAUGU		1213	Webb et Zakian, 2008; Leonardi et al., 2008

Tableau 2 : séquence matrice de la composante ARN de la télomérase chez différents organismes

La télomérase est active dans les cellules germinales et les cellules souches, mais serait réprimée chez la plupart des cellules somatiques humaines durant le développement (Blackburn et al., 1992; Wright et al., 1996).

L'activité télomérase est répertoriée dans la plupart des lignées cellulaires immortalisées et dans environ 85% des cellules cancéreuses (Counter et al., 1992; Kim et al., 1994; Shay et Wright, 1996; Shay et Bacchetti, 1997). hTERT a été identifiée comme la composante catalytique de la télomérase et est le facteur limitant pour son activité (Meyerson et al., 1997; Nakamura et al., 1997; Nakamura et al., 1998; Harrington et al., 1997). L'induction de hTERT empêche la sénescence et prolonge la durée de vie des cellules normales humaines primaires, et l'expression de hTERT en combinaison avec deux oncogènes résulte en la conversion tumorigénique directe des cellules normales humaines (Bodnar et al., 1998; Hahn et al., 1999). Ces résultats suggèrent donc que hTERT joue un rôle important dans la sénescence cellulaire et la tumorigénèse et dès lors pourrait être la cible pour des méthodes qui préviendraient ces deux événements.

La télomérase chez l'humain

La composante catalytique humaine : hTERT

hTERT (human telomerase reverse transcriptase) (Meyerson et al., 1997; Kilian et al., 1997; Nakamura et al., 1997) est le facteur limitant pour la régulation de l'activité télomérase; le niveau d'expression de hTERT change proportionnellement avec le niveau d'activité télomérase.

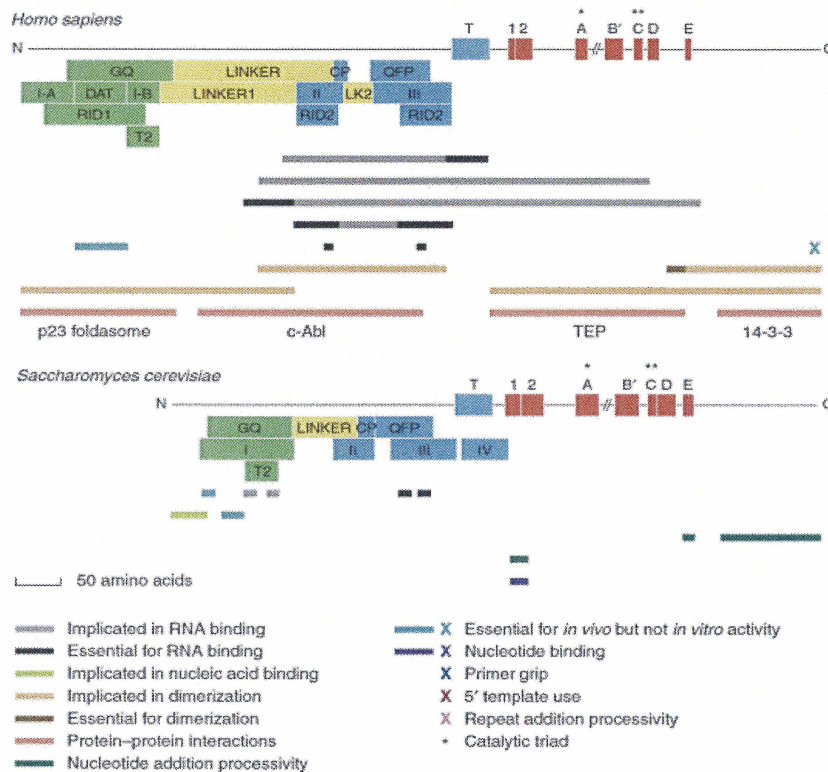


Figure 6 : homologie entre les domaines TERT humain et levure

Organisation structurale et fonctionnelle proposé des domaines de TERT chez l'humain (haut-Homo sapiens) et la levure (bas-S. cerevisiae). Domaine N-terminal (vert), domaine de liaison à l'ARN (bleu), domaine reverse transcriptase (RT) (rouge), domaine C-terminal comprenant la région entre le domaine RT "E" et le C-terminus. Les régions définies comme de liaisons sont représentées en jaune. Tiré de Kelleher et al., 2002.

RT conservés et un domaine C-terminal faiblement conservé (figure 6). Les 7 motifs RT des TERT sont similaires aux RT virales et des substitutions d'amino-acides au sein des motifs transcriptase inverse mènent au raccourcissement des télomères et à la sénescence chez la levure, indiquant que ces motifs sont importants pour la catalyse de l'élongation des télomères.

Un certain nombre de protéines sont connues pour s'associer à hTERT comme TEP1, p23 et hsp90, 14-3-3, Ku70/86 (Beattie et al., 2000; Holt et al., 1999; Seimiya et al., 2000; Chai

L'analyse de la famille protéique TERT d'organismes distants au niveau de l'évolution révèle une organisation structurale conservée, qui peut être grossièrement divisée en 4 domaines fonctionnels : un domaine N-terminal, un domaine de liaison à l'ARN, le domaine transcriptase inverse (RT) contenant 7 motifs

et al., 2002) et joueraient un rôle dans l'assemblage et la conformation du complexe RNP, la localisation nucléaire de la télomérase et l'accès de la télomérase aux télomères.

La composante ARN humaine : hTR

La composante ARN (451 nt) de la télomérase humaine hTR (human telomerase RNA) (Feng et al., 1995) fournit la matrice pour la transcription inverse et spécifie la synthèse de la séquence ADN télomérique. hTR est hautement exprimée dans tous les tissus indépendamment de l'activité télomérase. hTR a une structure secondaire assez conservée avec les ARNs de la télomérase d'une variété d'espèces de vertébrés, indiquant un rôle important de la structure ARN dans la fonction télomérase (Chen et al., 2000). Les domaines conservés au sein de la molécule hTR sont des sites de reconnaissance pour des protéines liant hTR. Le motif H/ACA ressemble à la boîte H/ACA des snoRNA et est lié par 4 protéines – dyskerin, hGAR1, hNOP10 et hnHP2 (Mitchell et al., 1999; Dragon et al., 2000; Pogacic et al., 2000; Dez et al., 2001) – qui sont impliquées dans la stabilité, la maturation et la localisation de l'ARN. D'autres protéines comme TEP1, hnRNP C1/C2 et hnRNP A1/UP1, La, hStau et L22 (Harrington et al., 1997; Pogacic et al., 2000; Ford et al., 2000; Fiset et Chabot, 2001; Ford et al., 2001; Le et al., 2000) interagissent avec hTR et participeraient, en plus des fonctions mentionnées ci-dessus, dans l'accès de la télomérase aux télomères. Deux régions au sein de hTR interagissent avec hTERT (Mitchell et Collins, 2000).

La région matrice de l'ARN de la télomérase des vertébrés s'échelonne entre 8-11 nt. 8 nt dans la région matrice sont absolument conservés parmi tous les ARN de la télomérase de vertébré connu. Les 6 premiers nucléotides conservés de la matrice hTR, 5'-CUAACC-3', servent

comme matrice pour la polymérisation de l'ADN, tandis que les 2 autres nucléotides conservés, 5'-CU-3', à l'extrémité 3' de la matrice sont nécessaires pour l'alignement au télomère durant la translocation. Les 4 bases adjacentes aux 8 nt essentiels ne sont pas conservées chez toutes les séquences de vertébrés, néanmoins lorsque ces résidus sont complémentaires à la séquence du télomère ils augmentent la processivité de la télomérase (Chen et Greider, 2003).

Régulation de l'activité télomérase

Différents modes régulent l'activité télomérase. Le promoteur de hTERT contient des sites de liaison pour de nombreux facteurs de transcription qui pourraient être impliqués dans sa régulation. L'abondance de ces sites potentiels de liaison pour les facteurs de transcription suggère que la régulation de l'expression de hTERT peut être sujette à de multiples niveaux de contrôle par différents facteurs dans des contextes cellulaires différents (Cong et al., 1999). Plusieurs facteurs de transcription sont connus pour être impliqués dans l'expression du gène *hTERT* en activant ou réprimant sa transcription (Wang et al., 1998; Misiti et al., 2000, Cong et Bacchetti, 2000). La régulation transcriptionnelle de *hTERT* est le principal niveau de contrôle dans la régulation de l'activité télomérase. Cependant, l'épissage alternatif (Ulaner et al., 2000), résultant en la production de formes inactives ou dominante négatives de hTERT (Cerezo et al., 2002; Colgin et al., 2000; Yi et al., 2000), et des modifications post-translationnelles de la protéine hTERT (revue dans Cong et al., 2002) pourraient être des niveaux de contrôle supplémentaires de l'activité télomérase.

Mécanisme d'action de la télomérase

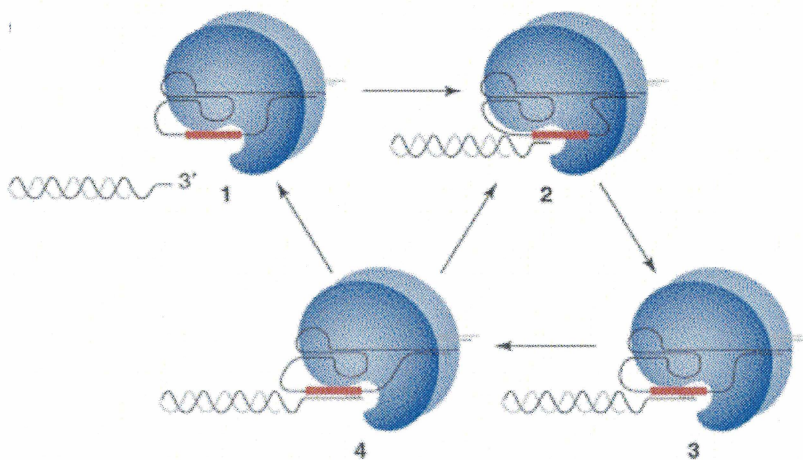


Figure 7 : mécanisme d'action de la télomérase

Différents états de la réaction sont représentés. La liaison au télomère implique l'appariement avec la matrice ARN (état 2). À chaque cycle de transcription inverse, une répétition télomérique est ajoutée (état 3). La frontière 5' de la matrice est la position où le substrat télomérique soit se dissocie (état 4 à 1) ou transloque (état 4 à 2) à l'autre extrémité de la matrice. Les composantes protéiques de la télomérase sont représentées en bleues et la région matrice de l'ARN en rouge. Tiré de Kelleher et al., 2002

Durant le processus d'extension des télomères, la télomérase utilise de façon répétée la même petite région au sein de sa composante ARN comme modèle pour la synthèse d'ADN. Cela requière une réaction cyclique représentée à la figure 7 qui peut se résumer en 3 étapes : appariements au simple brin

télomérique riche en G, polymérisation, et translocation ou désappariement. Bien que les mécanismes qui assurent cette réaction cyclique soient peu connus, il est clair que des changements dans les propriétés biochimiques de la télomérase durant la réaction cyclique ont lieu aux transitions entre les différents états (Kelleher et al., 2002).

Des études indiquent que le complexe télomérase humain agirait sous forme de multimères. En effet, la masse moléculaire native de l'enzyme recombinante correspondrait à un dimère, où chaque complexe télomérase serait constitué de 2 molécules ARN interdépendantes qui coopèrent entre elles (un hétérodimère télomérase contenant une matrice ARN WT et l'autre mutante est inactif par comparaison avec un homodimère WT)

(Wenz et al., 2001; Tesmer et al., 1999), et au moins deux sous-unités hTERT (deux fragments hTERT inactifs séparément peuvent se compléter fonctionnellement entre eux pour reconstituer une activité télomérase) (Moriarty et al., 2002; Ambruster et al., 2001; Beattie et al., 2001; Arai et al., 2002; Wenz et al., 2001; Huard et al., 2003). Les modèles proposés qui pourraient expliquer les rôles biologiques et enzymatiques de la dimérisation de la télomérase sont revus dans Kelleher et al., 2002.

Reconstitution de l'activité télomérase humaine

La reconstitution de l'activité télomérase humaine a été rapportée dans différents systèmes. L'addition de hTR transcrit *in vitro*, à des extraits de cellules télomérase négative exprimant hTERT, reconstitue une activité télomérase humaine (Tesmer et al., 1999). L'expression de hTERT en présence de hTR recombinant dans un lysat de réticulocyte de lapin (RRL) reconstitue une RNP télomérase qui est catalytiquement active *in vitro* (Weinrich et al.; 1997; Beattie et al., 1998; Bachand et Autexier, 1999). Une télomérase humaine fonctionnelle peut aussi être reconstituée *in vitro* en co-exprimant hTERT et hTR chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Bachand et Autexier, 1999). Bachand et al. en 2000 ont démontré également que une RNP télomérase humaine fonctionnelle pouvait être reconstituée chez la levure *S. cerevisiae* par l'expression bicistronic de hTERT et hTR, où hTERT et hTR sont exprimés à partir de la même molécule ARN en *cis*.

Ces études suggèrent que hTR et hTERT sont les composantes minimales requises pour l'activité télomérase *in vitro* (Masutomi et al., 2000). Le mécanisme moléculaire par lequel hTERT et hTR sont assemblés en une RNP fonctionnelle *in vivo* et *in vitro* reste inconnu.

La télomérase chez *Saccharomyces cerevisiae*

Chez la levure bourgeonnante *S. cerevisiae*, au moins 5 gènes sont requis pour la voie de réplication des télomères par la télomérase (Nugent et al., 1996; Lundblad et Szostak, 1989; Lendvay et al., 1996; Singer et Gottschling, 1994). *TLC1* et *EST2* encodent respectivement pour la sous-unité ARN et la transcriptase inverse de la télomérase (Singer et Gottschling, 1994; Counter et al., 1997; Lingner et al., 1997). De plus, la télomérase de levure contient au moins deux protéines accessoires, Est1p, Est3p (Hugues et al., 2000; Lendvay et al., 1996; Lin et Zakian, 1995; Steiner et al., 1996). Cdc13p, une protéine essentielle qui lie le simple brin télomérique TG₁₋₃, joue un rôle crucial dans l'accès de la télomérase à son substrat chromosomique en interagissant directement avec Est1p. Une déficience dans *TLC1*, *EST1*, *EST2* ou *EST3* mène au phénotype *est* (ever shortening telomeres), c.a.d un raccourcissement progressif des télomères menant éventuellement à la mort cellulaire (Nugent et Lundblad, 1998) (figure 8).

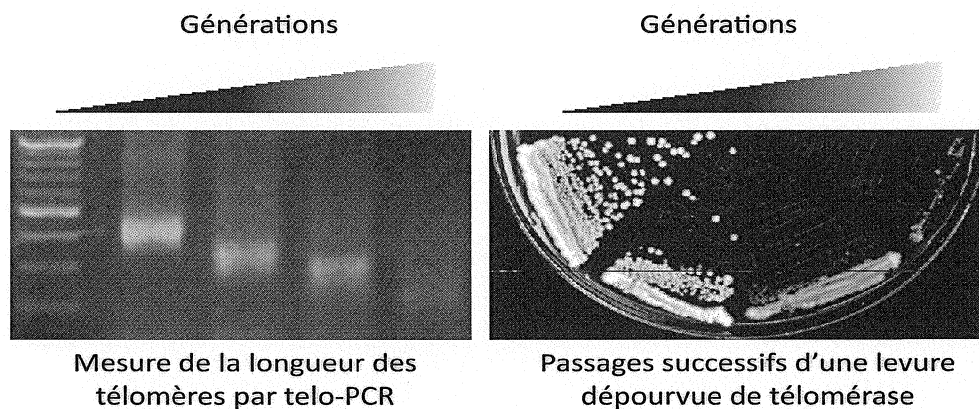


Figure 8 : sénescence répllicative chez la levure.
Longueur des télomères versus viabilité cellulaire. Images de T. Teixeira

L'expression du mutant catalytique dominant négatif *est2D670A* mène également à ce phénotype de sénescence (Lingner et al., 1997). *In vitro* seul *EST2* et *TLC1* sous forme d'un

complexe stable sont essentiels (Zapulla et al., 2005); alors que *in vivo*, ces 5 gènes plus au moins une des kinases de la famille ATM/ATR sont requis pour l'activité enzymatique (Singer et Gottschling, 1994; Lingner et al., 1997; Cohn et Blackburn, 1995; Ritchie et al., 1999).

L'ARN Tlc1, dont la structure secondaire a été élucidée en 2004 (Dandjinou et al., 2004; Zappulla et Cech, 2004) est présent sous deux formes distinctes chez la levure : un transcrit polyadénylé d'une durée de vie courte [poly(A)⁺ Tlc1] et une forme plus abondante et plus stable [poly(A)⁻ Tlc1], laquelle est dérivée de la forme poly(A)⁺ (Chapon et al., 1997). L'élongation des télomères par la télomérase a lieu par transcription inverse d'une petite partie de la composante ARN de la télomérase où 5'-CACCACACCCACACAC-3' est la séquence utilisée comme matrice, complémentaire aux répétitions télomériques de levure (Singer et Gottschling, 1994). Toutes modifications au sein de cette séquence matrice vont modifier la nature des répétitions télomériques ajoutées aux extrémités endogènes des chromosomes ainsi que des perturbations de l'activité enzymatique (discuté plus loin). La surexpression de *TLC1* cause une diminution de la longueur des télomères et supprime la répression transcriptionnelle aux télomères (Singer et Gottschling, 1994); la perte de *TLC1* cause une diminution progressive des télomères (3 pb par génération, sénescence à 70-90 Gén.) et une diminution graduelle du taux de croissance et de la viabilité (Singer et Gottschling, 1994) (figure 8).

Cdc13p et Est1p lient l'ADN télomérique simple brin mais avec une moindre affinité pour Est1p (Nugent et al., 1996; Virta-Pearlman et al., 1996; Lin et Zakian, 1996). Il a été proposé que Est1p et Cdc13p agiraient comme co-médiateur de l'accès de la télomérase aux télomères. Est1p est impliquée seulement dans la voie de la télomérase en liant Tlc1 et en assurant l'accès de la télomérase aux télomères (Evans et Lundblad, 1999; Virta-Pearlman et al.,

1996; Zhou et al., 2000), alors que Cdc13p a une fonction essentielle aux télomères en protégeant les extrémités chromosomales (Garvik et al., 1995), et en jouant un rôle dans la réplication des télomères (Nugent et al., 1996). Est3p s'associe à la télomérase de levure à travers son domaine OB-fold (Lee et al., 2008), mais sa fonction au sein du complexe est toujours inconnue.

L'action de la télomérase aux télomères est limitée en fonction du cycle cellulaire, indiquant qu'une modification dans la structure des télomères serait requise pour l'action de la télomérase (Marcand et al., 1999; Diede et Gottschling, 1999; Taggart et al., 2002; Smith et al., 2003). Les composantes de l'holoenzyme télomérase Est2p, Tlc1, Est1p et Est3p formeraient un complexe qui agirait tardivement durant la réplication des chromosomes (fin de phase S) à travers le recrutement par Cdc13p (Evans et Lundblad, 1999; Qi et Zakian, 2000; Pennock et al., 2001; Taggart et Zakian, 2002). Est1p, Est2p, et Cdc13p sont associés aux télomères en fin de phase S. Néanmoins, Est2p, mais pas Est1p lie aussi les télomères avant la fin de la phase S. Ces résultats suggèrent un modèle dans lequel Est1p est un activateur de la télomérase régulé en fonction du cycle cellulaire qui se lie à un complexe inactif Est2p-TLC1 lié aux télomères en fin de phase S et par la suite interagit avec Cdc13p lié à l'extension riche en G. Cette interaction change l'état de Est2p, dont la liaison aux télomères est maximale en fin de phase S, et résulte en l'activation de la télomérase pour la synthèse *de novo* d'ADN télomérique (Taggart et Zakian, 2002). La dégradation régulée en fonction du cycle cellulaire de Est1p via le protéasome et la RNase III de levure Rnt1p contrôlerait l'activation de la télomérase (Osterhage et al., 2006; Larose et al., 2007).

Les télomères de souches *cdc13-Δ* exprimant la protéine de fusion Cdc13-Est1p sont plus long que des cellules WT ce qui démontre que l'augmentation de l'association entre Cdc13p et la télomérase contribue à l'augmentation de la longueur des télomères (Evans et Lundblad, 1999). La nécessité de Est1p dans la maintenance des télomères peut être surpassée en fusionnant Cdc13p à Est2p (Evans et Lundblad, 1999). Cela supporte l'hypothèse que la fonction essentielle de *S. cerevisiae* Est1p est de promouvoir l'accès de la télomérase aux télomères.

RPA (replication protein A) est une protéine de liaison à l'ADN simple brin impliquée dans les processus de réplication, recombinaison, transcription, point de contrôle du cycle cellulaire, maintenance des télomères et la réparation de l'ADN (Longhese et al., 1994; Wold, 1997; Smith et al., 2000). Schramke et al. ont démontré en 2004 que RPA régule l'action de la télomérase durant le cycle cellulaire en facilitant spécifiquement la liaison de Est1p aux télomères en fin de phase S. Le rôle de RPA dans le chargement de Est1p aux télomères serait conservé en fonction de l'évolution : RPA et Est1p sont tous deux présents aussi bien chez l'humain que les cellules de levures (Wold, 1997; Reichenbach et al., 2003; Snow et al., 2003).

Comme chez l'humain, des évidences supporteraient l'idée que la télomérase de levure contiendrait plus qu'un site actif par complexe RNP télomérase. Au moins deux molécules ARN interagissant de façon fonctionnelle seraient présentes et toutes deux agiraient comme matrice pour la polymérisation de l'ADN, mais l'implication directe de Est2p dans de telles interactions n'a pas été évoquée (Prescott et Blackburn, 1997).

Maintien des télomères en absence de télomérase

Des mécanismes indépendants de la télomérase pour la maintenance des télomères existent chez les organismes qui normalement privilégient la voie de la télomérase. Des télomères qui ont été allongés à travers des mécanismes impliquant la recombinaison homologue dépendante du gène *RAD52* émergent chez les cellules de *S. cerevisiae* et *K. lactis* dépourvues d'une ou plusieurs composantes de la télomérase et qui survivent au delà de la phase de sénescence cellulaire (Lundblad et Blackburn 1993; McEachern et Blackburn, 1996; Teng et Zakian, 1999) : ces cellules sont nommées « survivants ».

Deux types de survivants, dont la structure des télomères diffère de celle de cellules WT, ont été décrits basé sur le profil des fragments produits après digestion avec l'enzyme de restriction *XhoI* (Lundblad et Blackburn, 1993; Teng et Zakian, 1999). Les survivants de type I ont une duplication en tandem de l'élément sous télomérique Y' et de courtes répétitions terminales C₁₋₃A/TG₁₋₃, alors que les survivants de type II sont caractérisés par une amplification faible des éléments Y' et de très longues extensions terminales d'ADN C₁₋₃A/TG₁₋₃. Ces deux types de survivants sont observés dans des souches *tlc1*, *est2*, *est3*, et *est4*, et requièrent tous deux la présence continue de Rad52p (Teng et Zakian, 1999). En contraste avec les survivants de type I, qui souvent peuvent revenir en un profil de type II d'ADN télomérique, le profil de type II des télomères est persistant à travers les générations. La maintenance de l'ADN télomérique chez les survivants de type II par recombinaison télomère-télomère dépendante de *RAD52* est un mécanisme aussi efficace que la télomérase, néanmoins après réintroduction d'une télomérase fonctionnelle, les télomères de types II retournent progressivement à leurs

longueurs WT d'origine, suggérant que l'expression de la télomérase supprimerait la recombinaison entre télomères (Teng et Zakian, 1999).

La structure des télomères chez les survivants de type II de *S. cerevisiae*, très longs et hétérogènes, est similaire à celle décrite chez les cellules humaines qui maintiennent leurs télomères par une voie indépendante de la télomérase nommée ALT (alternative lengthening of telomeres) (Bryan et al., 1995; Bryan et al., 1997). Contrairement à la levure, chez les cellules humaines l'activité ALT et la télomérase peuvent coexister (Cerone et al., 2001; Ford et al., 2001; Grobelny et al., 2001; Perrem et al., 2001).

Mutations dans la région matrice de *TLC1*

Des mutants de la matrice ARN de la télomérase ont été exprimés et caractérisés chez les levures bourgeonnantes, les cellules de mammifères, et chez *Tetrahymena* (Blackburn et al., 2000). De telles séquences mutées causent une nette augmentation ou diminution de la longueur des télomères (Yu et al., 1990; Singer et Gottschling, 1994 ; McEachern et Blackburn, 1995; Prescott et Blackburn 1997b, 2000) et, dans certains cas, des fusions télomériques menant à des ségrégations aberrantes des chromosomes (Yu et al., 1990; Kirk et al., 1997; Smith et Blackburn, 1999; McEachern et al., 2000a). Certaines séquences matrices altérées chez *Tetrahymena* et *S. cerevisiae* causent aussi de mauvaises incorporations de bases et également d'autres défauts dans les activités enzymatiques de la télomérase *in vitro* et *in vivo* (Yu et Blackburn, 1991; Gilley et al., 1995; Gilley et Blackburn, 1996; Prescott et Blackburn, 1997).

Des souches de levure *S. cerevisiae* avec une mutation de 2 bases au sein de la séquence matrice 3'-CACACACCCggACCAC-5' utilisent cette séquence pour l'incorporation de répétitions modifiées aux télomères nouvellement formés; les télomères de ces souches sont un peu plus courts et plus hétérogènes en longueur par rapport aux souches isogéniques non modifiées (Singer et Gottschling, 1994).

Une modification de 3 bases dans la région matrice de *TLC1* chez *S. cerevisiae*, 3'-CACACgugCACACCAC-5' *tlc1-476gug*, abolit complètement l'activité enzymatique *in vitro* et *in vivo*, les télomères de telles souches diminuent au cours des divisions et ceci mène à la sénescence cellulaire (Prescott et Blackburn, 1997). Des mutations ponctuelles simples ou doubles, toujours au sein des mêmes trois bases mutées *476gug*, préservent l'activité télomérase *in vitro* suggérant que l'abolition d'activité au sein du triplet mutant *gug* résulte de l'effet combiné de toutes les 3 substitutions (Prescott et Blackburn, 2000).

Ces deux études montrent que la séquence matrice au sein de l'ARN *TLC1* ne fournit pas seulement les bases utilisées par la télomérase pour diriger la synthèse *de novo* d'ADN télomérique mais contribue aussi aux propriétés enzymatiques.

Également, toutes les combinaisons de mutants possibles, toujours au sein de cette même région 474 à 476 de la séquence matrice, ont été réalisées (Lin et al., 2004). Le phénotype télomérique varie en fonction du type de mutations, de très court à très long, et les souches modifiées incorporent les mutations de la matrice aux télomères ainsi que des bases non attendues. La matrice ARN de la télomérase affecte donc aussi la régulation de la longueur des télomères.

Bien que les taux de croissance et profils télomériques varient extrêmement en fonction des mutations dans *tlc1*, la séparation et la ségrégation des chromosomes sont toujours aberrantes. Les souches avec une matrice ARN modifiée montrent des défauts dans la séparation des chromatides sœurs aux télomères, suggérant l'activation d'un point de contrôle du cycle cellulaire. Celui-ci est unique et distinct de ceux activés par la délétion de la télomérase ou les dommages à l'ADN (Lin et al., 2004).

Finalement, une étude assez originale rapporte la présence de télomères humains chez la levure. En effet, la substitution complète des 16 bases de la séquence matrice de *TLC1* par une séquence matrice humaine permet l'addition de répétitions télomériques humaines aux extrémités endogènes des chromosomes de levure : en 1998 on parle pour la première fois de levures humanisées (Henning et al., 1998).

Régulation de la longueur des télomères chez *S. cerevisiae*

La longueur des télomères de cellules exprimant la télomérase est maintenue constante à l'intérieur d'une fenêtre étroite, résultat d'un équilibre précis entre les activités d'élongations et de raccourcissements des télomères où différents protagonistes interviennent (Hug et Lingner, 2006).

La séquence matrice de l'ARN de la télomérase dirige normalement la synthèse des répétitions télomériques, lesquelles contiennent des sites spécifiques de liaison à l'ADN pour des protéines impliquées dans la régulation de la longueur des télomères et leurs protections. Ces protéines correspondent au complexe autour de Rap1p et Cdc13p chez *S. cerevisiae* (Krauskopf et Blackburn, 1998), Taz1p et Pot1p chez *S. pombe* (Cooper et al., 1997), et le

complexe Shelterin chez les cellules de mammifères (Palm et de Lange, 2008). Dès lors, tout changement au sein de la séquence matrice peut avoir une influence directe sur la liaison de ces protéines et de ce fait peut influencer la longueur des télomères et leur intégrité.

Chez la levure, la liaison spécifique de Rap1p à la séquence télomérique consensus $R^C/AAYCCRYNCAYY$ toutes les 18 bp permet l'assemblage d'un complexe macromoléculaire protéine-ADN qui contrôle l'accessibilité des nucléases, de la télomérase, et des protéines impliquées dans la recombinaison et la réparation de l'ADN (figure 9). Cette structure protège donc les télomères de la dégradation et de l'élongation non contrôlée et maintient une distribution précise de la longueur des télomères qui est spécifique à une espèce et spécifique à une souche (Hardy et al., 1992; Kyrion et al., 1992; Marcand et al., 1997; Wotton et Shore, 1997; Krauskopf et Blackburn, 1998; Smith et Blackburn, 1999).

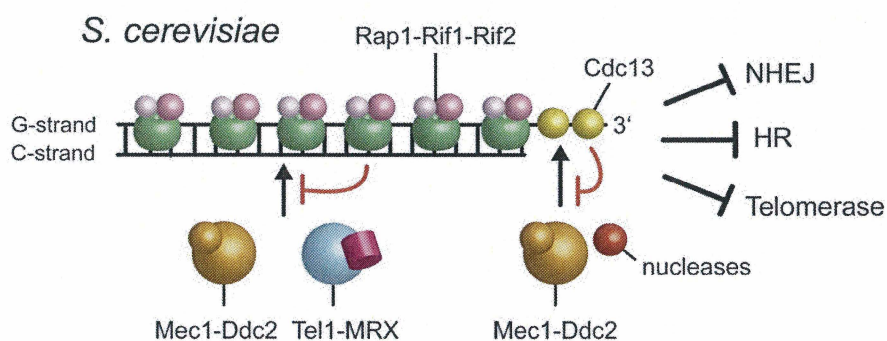


Figure 9: protection de la fin des chromosomes chez la levure *S. cerevisiae*
La liaison de Rap1 inhiberait le recrutement de MRX, RPA, Mec1, et de la télomérase aux télomères, alors que la liaison de Cdc13p au simple brin télomérique préviendrait la liaison des nucléases et ainsi empêchera le recrutement de RPA et l'activation du checkpoint dépendant de Mec1 qui en découle. Tiré de Longhese 2008.

Le nombre de molécules Rap1p assemblé à un télomère soit 10 à 20 molécules, et plus spécifiquement les parties C-terminales de Rap1p, est compté et maintenu activement à une valeur moyenne constante : c'est le mécanisme prévalent de mesure de la longueur des télomères par comptage des molécules Rap1p (Marcand et al., 1997). Le modèle proposé est un système rétroactif dans lequel un télomère lié par un nombre juste voire en léger excès de molécules Rap1p est dans un état qui prévient l'élongation des télomères, possiblement par l'assemblage d'une structure qui inhibe la liaison de la télomérase ou son activité; quand la dégradation ou la réplication incomplète de ce télomère cause la perte d'un voire plusieurs sites de liaison Rap1p, la chromatine télomérique change pour un nouvel état qui permet son élongation; l'élongation des télomères restore le ou les sites de liaison Rap1p manquant, et le télomère retourne à son état de répression initial. De cette façon, l'homéostasie entre l'addition et la perte de séquence télomériques peut être établie (Marcand et al., 1997). Ce modèle est en accord avec l'élongation extensive des télomères (et une distribution hautement hétérogène des tailles des télomères) observée chez les cellules où Rap1p est dépourvu de son domaine C-terminal (*rap1^t* allèles) (Kyrion et al., 1992).

Les molécules Rap1p interagissant avec les protéines Sir, impliquées dans l'établissement du silençage, ne sont pas prises en compte par le mécanisme de mesure de la longueur des télomères (Marcand et al., 1997). Les complexes Sir-Rap1 sont restreints du côté centromérique du télomère là où les nucléosomes sont rencontrés en premier, laissant les molécules Rap1p plus distales libres d'interagir avec Rif1p et Rif2p pour réguler la longueur des télomères. La délétion de Rif1p ou Rif2p résulte en l'augmentation de la longueur des télomères alors que la délétion des deux résulte en une augmentation dramatique de la

longueur des télomères et ce dans un contexte où les cellules expriment la télomérase (Sussel et Shore, 1991; Kyrion et al., 1992).

Dans un second mécanisme, la protéine Cdc13p liant le simple brin télomérique, recrute de multiples complexes, lesquels agissent pour maintenir une balance entre l'élongation et la perte des répétitions télomériques au niveau de l'extension 3' terminale (Chandra et al., 2001; Grandin et al., 2000, Grandin et al., 2001; Lustig, 2001; Pennock et al., 2001; Qi et Zakian, 2000).

Avec une approche expérimentale originale qui consistait à suivre l'élongation d'un télomère unique, il a été démontré que les télomères adoptent différentes configurations qui régulent l'action de la télomérase. Celle-ci n'agit pas simultanément sur chaque télomère à chaque cycle cellulaire mais sur quelques télomères par addition de quelques à plus de 100 nt indépendamment de la longueur du télomère. Toutefois elle aurait une préférence pour les télomères dont la longueur diminue, ce qui suggère des transitions entre des états de non-extension des télomères et des états d'extension des télomères (Teixeira et al., 2004).

Des études à l'échelle du génome entier de la levure *S. cerevisiae* ont permis d'identifier des gènes qui affectent la taille des télomères. Dans deux premières études, l'analyse par Southern Blot des fragments terminaux de restriction (TRFs) de 4750 souches issues d'une collection de souches haploïdes où chaque gène a été délété, a permis d'établir que la délétion de 272 gènes, soit 5% des gènes non essentiels, provoquent un raccourcissement ou un rallongement des télomères. Parmi ceux-ci on retrouve des gènes impliqués dans le métabolisme de l'ADN et de l'ARN, le remodelage de la chromatine et le transport vésiculaire (Askree et al., 2004 ; Gatbonton et al., 2006).

Cette liste de gènes non essentiels influençant la longueur des télomères a été récemment complétée par l'analyse des gènes essentiels provenant d'une collection de souches haploïdes, où chaque souche correspond à un allèle hypomorphe d'un gène essentiel. Parmi les 739 souches analysées, 86 gènes affectent la longueur des télomères, soit un peu plus de 11% des gènes essentiels analysés (Ungar et al., 2009).

Ces études révèlent donc la complexité du mécanisme de maintenance des télomères à une longueur constante, où différents gènes impliqués dans différents processus cellulaires y participent.

A titre d'exemple le complexe «KEOPS», *kinase putative endopeptidase and other proteins of small size*, isolé lors d'un criblage à l'échelle du génome entier de *S. cerevisiae* pour des gènes supprimant le défaut de croissance de cellules Cdc13-1 à température restrictive, a permis l'identification des gènes non essentiels CGI121, BUD32, GON7 et du gène essentiel KAE1 qui sont des régulateurs positifs de la longueur des télomères, la délétion d'un de ces gènes entraînant un raccourcissement des télomères (Downey et al., 2006).

Objectifs

L'activation de la télomérase conduit à l'immortalisation des cellules de mammifères en culture et est aussi une propriété générale des cellules tumorales humaines (Counter et al., 1992; de Lange, 1994). Dès lors, la télomérase est donc considérée comme une cible privilégiée pour le développement de drogues pour la thérapie du cancer. Pour cette raison il est essentiel d'élucider comment cette enzyme est régulée.

L'objectif principal de ma thèse était d'étudier la régulation de la télomérase humaine dans un système génétique attractif : la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'expression fonctionnelle d'une télomérase humaine agissant aux extrémités des chromosomes de la levure *S. cerevisiae* fournirait des outils biochimiques et génétiques avantageux pour étudier la fonction de cette enzyme.

Dans une étude précédente nous rapportons que l'expression des composantes centrales de la télomérase humaine (TERT et TR), chez la levure humanisée ayant le substrat télomérique humain adéquat pour cette enzyme, n'étaient pas capables d'ajouter des répétitions télomériques humaines aux extrémités des chromosomes de la levure, et ce malgré qu'une activité télomérase humaine était reconstituée à partir des extraits protéiques de ces cellules de levure (Bah et al., 2004).

Dans le cadre de ma thèse j'ai poursuivi ces travaux dans le but de créer ce système de levure humanisée dont la survie serait dépendante de la télomérase humaine.

En parallèle à ce projet, je devais approfondir mes connaissances sur le modèle de la levure humanisée en répondant aux questions suivantes :

- Comment une levure peut maintenir des répétitions télomériques humaines aux extrémités de ses chromosomes ?
- Quelles sont les conséquences cellulaires associées à l'humanisation des télomères ?

CHAPITRE I

Humanisation des télomères chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et activation des points de contrôle

Préambule

La génération de levures avec des télomères humains est rendue possible grâce à la modification de la séquence matrice de *TLC1*. Une étude structurale assez fine a permis de mieux comprendre l'organisation des télomères chez la levure humanisée (Bah et al., 2004). Afin de déterminer l'impact sur la cellule de ces répétitions télomériques humaines aux extrémités des chromosomes de la levure, la progression de ces cellules à travers le cycle cellulaire a été étudiée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches utilisées

Les cellules utilisées sont dérivées de la souche RWY12 (Mat a ura3-52 lys 2-801 ade2-101 trp1- Δ 1 his3- Δ 200 leu2- Δ 1 tlc1 Δ ::LEU2 VR-ADE2-T) qui contient le plasmide pAZ1 (*TLC1*, URA3) (Dionne et Wellinger, 1996). Cette souche a été transformée parallèlement avec pTLC1hTRP (séquence matrice humaine) ou pTLC1TRP (séquence matrice levure). Les cellules

contenant ces plasmides ont été striées sur milieu 5-FOA de façon à perdre le plasmide pAZ1. En effet, le 5-FOA peut se convertir en un intermédiaire toxique pour les cellules qui expriment le gène *URA3*. Le 5-FOA va sélectionner les cellules qui auront perdues le gène *URA3* au préalable. Dès lors, une composante ARN unique, pTLC1hTRP ou pTLC1TRP, est présente et utilisable par la cellule pour générer la levure humanisée ou la levure isogénique de type sauvage respectivement. Ces cellules ont été cultivées sur milieu synthétique YC-LEU-TRP Glc (additionné de 2% glucose) pour maintenir la sélection *tlc1Δ::LEU2* et le plasmide pTLC1(h)TRP.

Dans l'étude de remplacement des séquences terminales humaines par de nouveau des répétitions télomériques levures, le plasmide pAZ1 a été introduit dans une levure humanisée, et la perte du plasmide pTLC1hTRP a été conditionnée en cultivant les cellules sur milieu synthétique YC-LEU-URA Glc. Après vérification de la perte du plasmide pTLC1hTRP sur milieu YC-LEU-URA-TRP Glc, les différentes analyses ont été effectuées à partir de cellules cultivées sur milieu YC-LEU-URA Glc.

Tests de viabilité cellulaire

Une souche WT et plusieurs souches humanisées à différentes générations ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle, et la concentration en cellules / mL a été déterminée pour chacune de ces cultures par mesure de la DO_{660nm} . Pour mesurer la capacité de ces cellules humanisées à former des colonies, 3 cultures pour chaque souche à la génération indiquée ont été cultivées. Après dilution, précisément 250 cellules ont été étalées sur boîtes YC-TRP-LEU Glc, et après 3 jours d'incubation à 30 °C les colonies viables résultantes de ces cellules ont été

comptées et comparées par rapport à la souche WT. Le nombre de générations correspond au nombre de restriages d'une colonie unique (estimé à 20 Gén.) d'une boîte à l'autre.

Pour mesurer la viabilité des levures humanisées, la méthode des spots sur boîtes a aussi été employée. À partir de chaque culture, 10^5 cellules ont été prélevées et diluées en série au $1/10^6$. 10 μ L de chaque dilution a été déposé sur milieu YC-TRP-LEU Glc.

Extraction ADN, détection de l'ADN télomérique

Les techniques d'isolation de l'ADN génomique de levure, digestion par l'endonucléase *XhoI* et analyses sur gel pour visualiser l'ADN télomérique simple brin ou double brin ont été effectuées selon LeBel et al., 2006.

Manipulations levures

La transformation de plasmides dans les levures a été effectuée selon Gietz et Schiestl, 2007a, 2007b et 2007c, et les levures ont été cultivées selon dans des conditions standards (Rose et al., 1990).

Préparation des extraits totaux de protéines

Les cellules en phase exponentielle ont été récoltées par centrifugation 5' à 3600 RPM (Sorvall t 6000D, H1000B rotor) pour obtenir 4×10^8 cellules. Les culots étaient resuspendus dans 2 mL TCA 20% pour éliminer le milieu de croissance et transférés dans un tube eppendorf de 2 mL. Les cellules ont été centrifugées de nouveau 5' et resuspendues dans 50 μ L TCA 20%. Un volume égal de billes de verre a été ajouté dans chaque tube et les cellules

ont été brisées 8' au vortex. Le contenu des tubes ainsi qu'un lavage de 400 µL de TCA 5%, ont été transférés dans un tube de 1,5 mL, et centrifugé 10' à 3000 RPM (Eppendorf Centrifuge 5415 R). Les culots ont été resuspendus dans 140 µL de tampon Laemmli 2X (100 mM Tris pH 6.8, 20% v/v glycérol, 4% m/v SDS, 0.2% bleu de bromophénol, 200 mM Betamercaptoéthanol) et 60 µL Tris Base 1M, et conservés à -80 °C.

Immunobuvardage de type Western

Des aliquots de protéines ont été bouillies 2' à 100 °C, centrifugées 10' à 3000 RPM (Eppendorf Centrifuge 5415 R), et séparés sur gel SDS-PAGE 8% où le ratio Acrylamide/Bis-Acrylamide 30::0.39 a été utilisé pour détecter les formes phosphorylées et non phosphorylées de la protéine Rad53p. Les protéines ont été transférées sur la nuit à 30 volts à 4°C sur une membrane de nitrocellulose Hybond C (GE healthcare). Après vérification de la qualité du transfert des protéines par coloration au rouge de Ponceau S, la membrane a été bloquée 1h à température ambiante dans une solution PBS-T (0.1% v/v Tween) + lait 5% m/v, hybridée 4h à température ambiante avec l'anticorps primaire anti-Rad53p dilué au 1/500^e dirigé contre le domaine FHA1 de la protéine Rad53p (cadeau du Dr Jörg Heierhorst, Melbourne, Australie), lavée 3 fois 10 min dans PBS-T + lait 5%, incubée 1h à température pièce avec l'anticorps secondaire anti-lapin conjugué à la peroxydase et provenant de l'âne dilué au 1/5000^e (GE Healthcare), lavée 3 fois 10 min dans PBS-T + lait 5% puis 2 fois 10 min dans PBS-T avant de faire la révélation avec le kit ECL plus (GE Healthcare).

Cycle cellulaire par FACS (fluorescence-activated cell sorting)

À partir d'une culture de cellules asynchrones en phase exponentielle ($0.7 < OD_{660nm} < 1.0$), 1 mL a été transféré dans un tube eppendorf, centrifugé 3 min à 2700 RPM (Eppendorf Centrifuge 5415 R), lavé avec 1 mL ddH₂O et centrifugé de nouveau. Les cellules ont été resuspendues dans 300 µL ddH₂O et 700 µL d'éthanol 100% froid. Les cellules ont été fixées après 1h d'incubation à température pièce ou sur la nuit à 4°C. Les cellules ont été centrifugées 5 sec à la vitesse maximale, lavées dans 500 µL PBS 1X, centrifugées de nouveau et resuspendues dans 500 µL PBS 1X contenant 1 mg/mL RNaseA (Roche Diagnostics, Laval, PQ, Canada), et incubées sur la nuit à 37 °C. Les cellules ont été centrifugées et resuspendues dans 500 µL PBS 1X additionné de iodure de propidium à 50 µg/mL (Sigma Diagnostics Canada, Mississauga, Ontario, Canada), incubées 3h à température pièce à l'abri de la lumière. Les cellules ont été récoltées et resuspendues finalement dans 500 µL PBS 1X additionné de iodure de propidium à 5 µg/mL, soniquées environ 10 sec (duty cycle \approx 40, output \approx 3) pour les séparer et le contenu en ADN des cellules a été déterminé par mesure de la fluorescence avec le FACScan (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Les données de cytométrie en flux ont été acquises et analysées avec le logiciel CELLQuestPro.

Clonage et séquençage des télomères

L'amplification, clonage et séquençage d'un télomère unique (marqué ADE2) au chromosome V-R de la souche RWY12, a été effectuée selon la méthode décrite dans Forstemann et al., 2000 et LeBel et al., 2006. Cette technique rapide repose sur trois étapes principales qui sont l'addition d'une queue poly-C à l'extension terminale du brin riche en G par

la «terminal deoxynucleotidyl transferase» (TdT) en présence de dCTP, l'amplification spécifique du télomère unique avec une amorce complémentaire à la queue poly-C (dG₁₈*Bam*HI) et une amorce spécifique pour la séquence distale au gène sous-télomérique *ADE2* (DIAV-I) puis, le clonage/séquençage des télomères. Cette méthode a permis de suivre l'évolution d'un seul télomère, celui du chromosome V droit marqué *ADE2*, du fait que l'amplification PCR était dépendante uniquement de la présence du gène *ADE2*. Néanmoins la distinction entre les séquences télomériques simple brin et double brin ne pouvait se faire par l'intermédiaire de cette approche.

RÉSULTATS

Des travaux antérieurs ont montré que la substitution des 16 nt de la région matrice du gène *TLC1* de levure 5' –CACCACACCCACACAC– 3' par une séquence matrice humaine 5' –CCUAACCCUAACCCUAACC– 3' (*tlc1h*) de 19 nt résultait en l'incorporation de répétitions humaines [C₃TA₂/T₂AG₃] parfaites à la place des répétitions levure [C₁₋₃A/TG₁₋₃] irrégulières à l'extrémité des chromosomes de levure (Henning et al, 1998, Alexander et al. 2003, Brevet et al. 2003). Constituées de séquences télomériques mixtes, ces levures nommées humanisées possèdent des télomères courts mais stables. Lors de mes travaux de Master j'ai pu approfondir ces travaux en étudiant plus en détail l'organisation structurale des télomères de levures humanisées (Figure 10). Ces résultats sont rapportés dans Bah et al., 2004 (annexe 1).

Organisation structurale des télomères chez la levure humanisée

L'organisation structurale des télomères de levures humanisées a été étudiée dans la souche RWY12. Cette souche a le gène *TLC1* invalidé au niveau du génome par le marqueur nutritionnel LEU2, et comporte une copie du gène *TLC1* sur le plasmide pTLC1(h)TRP (marqueur TRP1) pour assurer le maintien des télomères.

L'ADN génomique de cellules sauvages et humanisées a été extrait à différentes générations (de 40 à 2500 Gén.), digéré avec l'enzyme *XhoI* et analysé sur gel dans des conditions natives ou dénaturantes en hybridant avec des sondes télomériques de différentes natures. Cette digestion génère un patron de bandes télomériques caractéristique lorsque hybridé avec une sonde télomérique, en coupant une fois dans la région sous télomérique Y', libérant ainsi un fragment terminal de restriction (TRF) de ~1,2 kb chez les cellules de type sauvage, où ~300 pb correspondent aux répétitions télomériques terminales proprement dites. De nombreux autres TRFs de plus grandes tailles sont aussi détectés et correspondent aux

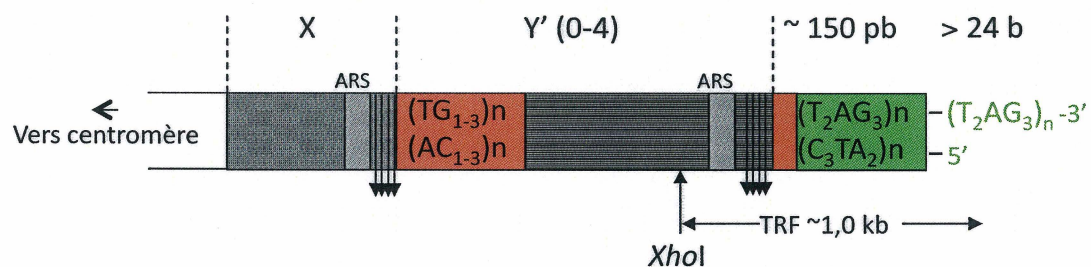


Figure 10 : organisation structurale des télomères chez la levure humanisée

L'humanisation de la télomérase par modification complète de la séquence matrice de levure permet l'ajout de répétitions télomériques humaines $[C_3TA_2/T_2AG_3]_n$ à l'extrémité 3' des chromosomes de levure (représenté ici en vert). Ces télomères sont répliqués par la télomérase et la machinerie conventionnelle et l'organisation des télomères est conservée par rapport aux télomères de la souche isogénique sauvage. L'extension 3' simple brin est supérieure à 24 bases (à 100 Gen.) et un TRF d'environ 1,0 kb est généré après coupure avec l'endonucléase *XhoI*. L'humanisation des télomères est graduelle en fonction du nombre de divisions cellulaires accomplis mais n'est pas complète : une quantité critique de répétitions levures de ~ 50 pb $[C_{1-3}A/TG_{1-3}]_n$ (rouge) est maintenue avant les répétitions humaines. Les flèches verticales orientées vers le bas représentent des répétitions télomériques humaines $[C_3TA_2/T_2AG_3]$ parfaites ou dégénérées toutes liées par Tbf1p.

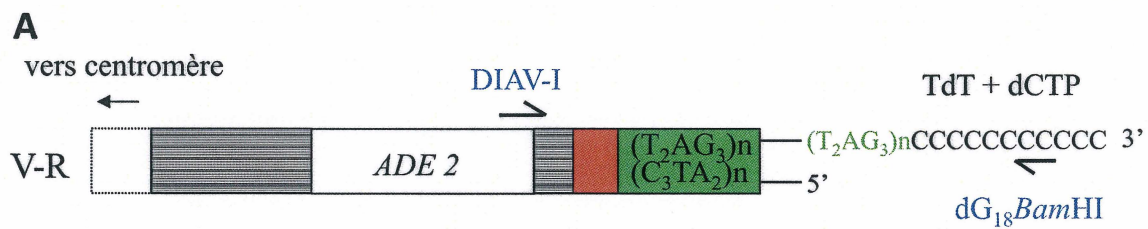
télomères dépourvus d'éléments Y'. L'hybridation avec la sonde télomérique humaine $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$ montre la présence d'ADN télomérique humain simple brin et double brin, et ce seulement pour les clones exprimant pTLC1hTRP. Néanmoins, les TRFs chez les cellules humanisées sont plus courts (~ 1,0 kb) par rapport aux cellules non modifiées (~ 1,2 kb). L'intensité du signal spécifique pour les répétitions télomériques humaines augmente avec le nombre de générations, ce qui suggère une augmentation de la quantité d'ADN télomérique humain (tous ces résultats sont revus en annexe 1).

Afin d'apprécier de plus près l'évolution des télomères chez les cellules humanisées, nous avons eu recours à la technique de clonage et séquençage des télomères.

La souche RWY12 contient une séquence sous-télomérique qui est unique à travers le génome (VR-ADE2-T). Nous avons pris avantage de cet élément pour adapter la technique de clonage et séquençage des télomères décrite par Forstemann et al. 2000 afin d'analyser la longueur des télomères dans notre souche humanisée RWY12 et d'apprécier la nature des différentes séquences télomériques.

Les mêmes ADN dérivés de cellules humanisées et analysés par southern ont été utilisés dans cette investigation. La compilation des résultats de séquençages est représentée à la figure 3 de l'annexe 1. De 40 à 150 Gén., deux populations de télomères sont présentes : télomères constitués exclusivement de répétitions levures et télomères mixtes constitués de répétitions humaines et levures. On peut noter que pour les télomères mixtes, les répétitions humaines sont toujours distales par rapport aux répétitions levures, la longueur des télomères est maintenue stable aux alentours de $\sim 150 \pm 50$ nt alors que pour les télomères seulement TG₁₋₃ on observe une diminution progressive de la longueur en fonction du nombre de

générations (barres blanches) pour ne laisser place qu'à des télomères mixtes (barres composites) aux générations suivantes (570 Gén. et plus). Les répétitions levures TG_{1-3} diminuent progressivement pour atteindre une longueur critique de 47 nt à 2500 Gén. et à l'inverse, les répétitions humaines T_2AG_3 augmentent graduellement (Bah et al., 2004). Le résultat de séquençage d'un télomère humanisé à 2500 Gén. est illustré à la figure 11.



B

```

1  TGAATACGACTCACTTATAGGGCGATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCC
51  GGCCGCCATGGCCGCGGGATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGTCTA
101 GATGTCCGAATTGATCCCAGAGTAGAGGTAGATGTGAGAGAGTGTGTGGG
151 TGTGGGTGTGGTGTGTGGGT GTGGTGTGTGGGTGTGGGTAGGGTTAGGG
201 TTAAGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGT
251 TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGT
301 TAGGGTTTAGGGTTAGGGTTAGCCCCCCCCCCCCCCCCCGGATCCCGAA
351 TCACTAGTGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGC

```

$$TG_{1-3} 47 \text{ nt} + T_2AG_3 134 \text{ nt} = \text{Télomère 181 nt}$$

Figure 11 : séquençage d'un télomère de levure humanisée

(A) Organisation du télomère VR-ADE2-T. **(B)** L'amplification, le clonage et le séquençage de ce télomère a été réalisé à partir de l'ADNg d'une levure humanisée ayant accumulée 2500 Gén. Les séquences identifiées sont dans l'ordre en bleu : amorce DIAV-I, noir en italique : séquence Y' restante, rouge : 47 nt de répétitions télomériques levures, vert : 134 nt de répétitions télomériques humaines, bleu : amorce dG₁₈-BamHI. Les séquences en noires à l'extérieur correspondent au plasmide vecteur pGEM-T.

En résumé, à partir des résultats d'analyses sur gel et séquençages de télomères, nous avons démontré que les cellules avec une matrice ARN humanisée sont capables d'ajouter des répétitions télomériques humaines à l'extrémité endogènes des chromosomes de levure, leurs télomères sont courts mais stables et qu'en fonction du nombre de générations accomplis il y avait une perte progressive des répétitions télomériques levures contrebalancée par une augmentation progressive des répétitions télomériques humaines. L'humanisation de ces télomères est donc graduelle mais non complète car même après 2500 Gén. un seuil critique de répétitions levures de 47 nt est protégé de l'action de la télomérase « humanisée ».

Activation des points de contrôle chez la levure humanisée

Un rôle important assuré par les télomères est de distinguer la fin des chromosomes des cassures ADN db. Ainsi cette organisation nucléoprotéique spéciale passe inaperçu par rapport aux points de contrôles de la cellule, et les séquences ADN terminales ne seront pas dégradées par des nucléases.

Nous avons voulu vérifier si les nouvelles séquences humaines présentes aux extrémités des chromosomes de levure assuraient le rôle de protection terminal en prévenant l'activation des points de contrôle. L'analyse du contenu en ADN de levures humanisées non synchronisées montre que dès les premières générations en présence de *tlc1h* la progression du cycle cellulaire n'est pas perturbée (figure 12A, HY 20G). À ce stade la majorité des télomères sont constitués exclusivement de répétitions télomériques levures $[C_{1-3}A/TG_{1-3}]$, une minorité de télomères est mixte et contient des répétitions télomériques humaines distales $[C_3TA_2/T_2AG_3]$. Aux générations 60, 120 et 200, il y a une légère accumulation des cellules en phase G2/M. À ce

stade, il y a toujours deux populations de télomères, uniquement levure dont la taille diminue progressivement et mixte levure plus humain où les répétitions $[C_3TA_2/T_2AG_3]$ remplacent graduellement les répétitions $[C_{1-3}A/TG_{1-3}]$. À partir de 500 Gén et plus, le délai en G2/M est de plus en plus prononcé; tous les télomères de ces cellules sont mixtes et le remplacement des séquences $[C_{1-3}A/TG_{1-3}]$ par $[C_3TA_2/T_2AG_3]$ se fait de plus en plus en profondeur. Aux générations 1000 et suivantes, en plus du délai en G2/M on peut noter également un déplacement du pic 2N vers la droite ce qui indique que le contenu en ADN de ces cellules est > 2N et pourrait refléter un phénotype d'aneuploïdie suite à des réarrangements

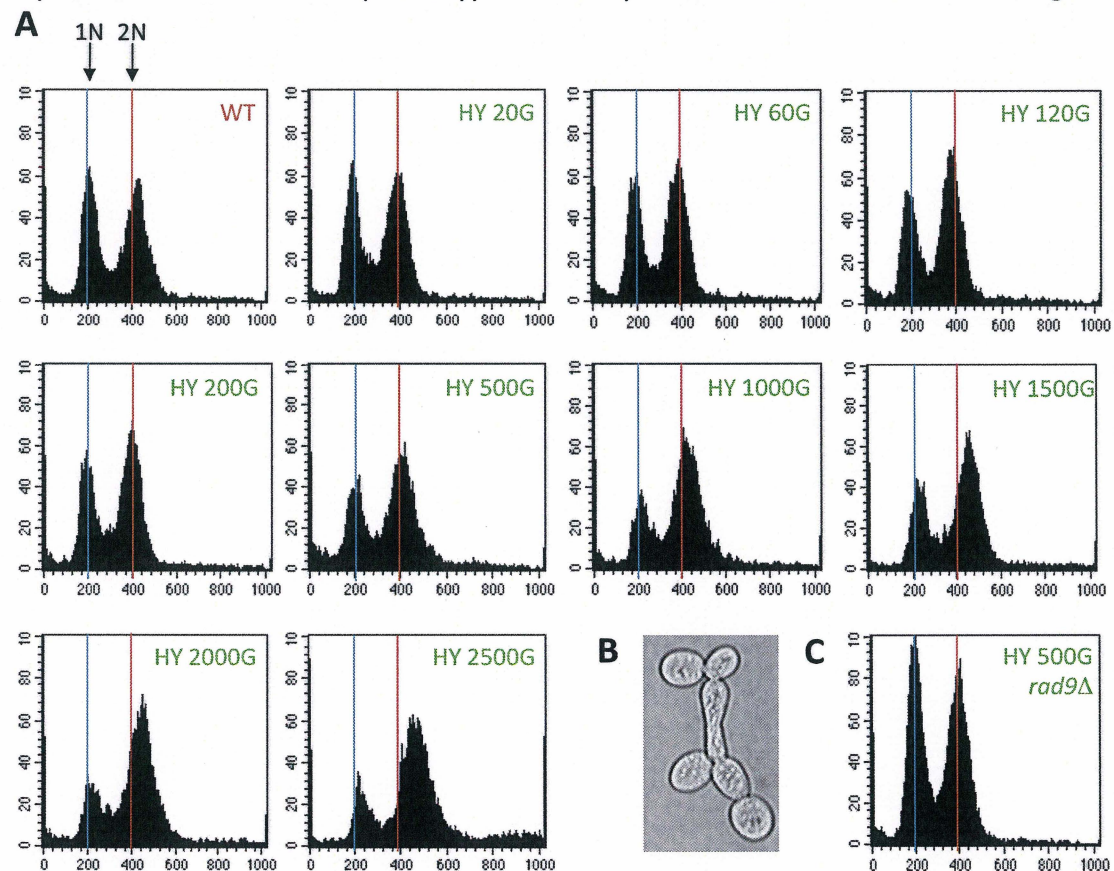


Figure 12 : cycle cellulaire chez la levure humanisée

(A) Les cellules d'une levure WT et de levures humanisées aux générations indiquées ont été analysées par FACS (10000 cellules analysées). L'intensité de la fluorescence en unité arbitraire versus le nombre de cellules est représenté par ces histogrammes. 1N et 2N correspondent à l'ADN non répliqué et répliqué respectivement. (B) Cytologie d'une cellule de levure humanisée à 2500 Gén. (C) Analyse FACS de cellules humanisées à 500 Gén. *rad9Δ* (15000 cellules analysées).

chromosomiques (discuté au chapitre II). Aux générations 2000 et 2500, il n'est pas rare de trouver des cellules «monstres» à multiples bourgeons comme illustré à la figure 12B, ce qui indiquerait un problème dans l'étape de cytokinèse.

Finalement, dans une levure humanisée à 500 Gén. inactivée pour le gène *RAD9*, plaque tournante dans la propagation du signal des points de contrôle en activant des protéines effectrices qui vont induire un délai dans différentes phases du cycle cellulaire en fonction du dommage, permet de rétablir un cycle cellulaire normal (figure 12C).

Diminution de la viabilité cellulaire chez la levure humanisée

La capacité à former des colonies de cellules humanisées a été mesurée pour apprécier leurs viabilités. Du début de l'humanisation des télomères jusqu'à 500 Gén., il y a très peu voire pas de baisse de la viabilité par rapport à la souche WT. Par contre, pour les générations tardives, 1000 Gén. et plus, on note un recul de la viabilité d'environ 20% jusqu'à 40% par rapport à la souche isogénique contrôle (figure 13A). Ces résultats corroborent avec l'essai de dilutions en série (figure 13B). Le temps de génération des levures humanisées à 2000 et 2500 Gén. est nettement augmenté par rapport aux cellules des générations précoces (données non montrées).

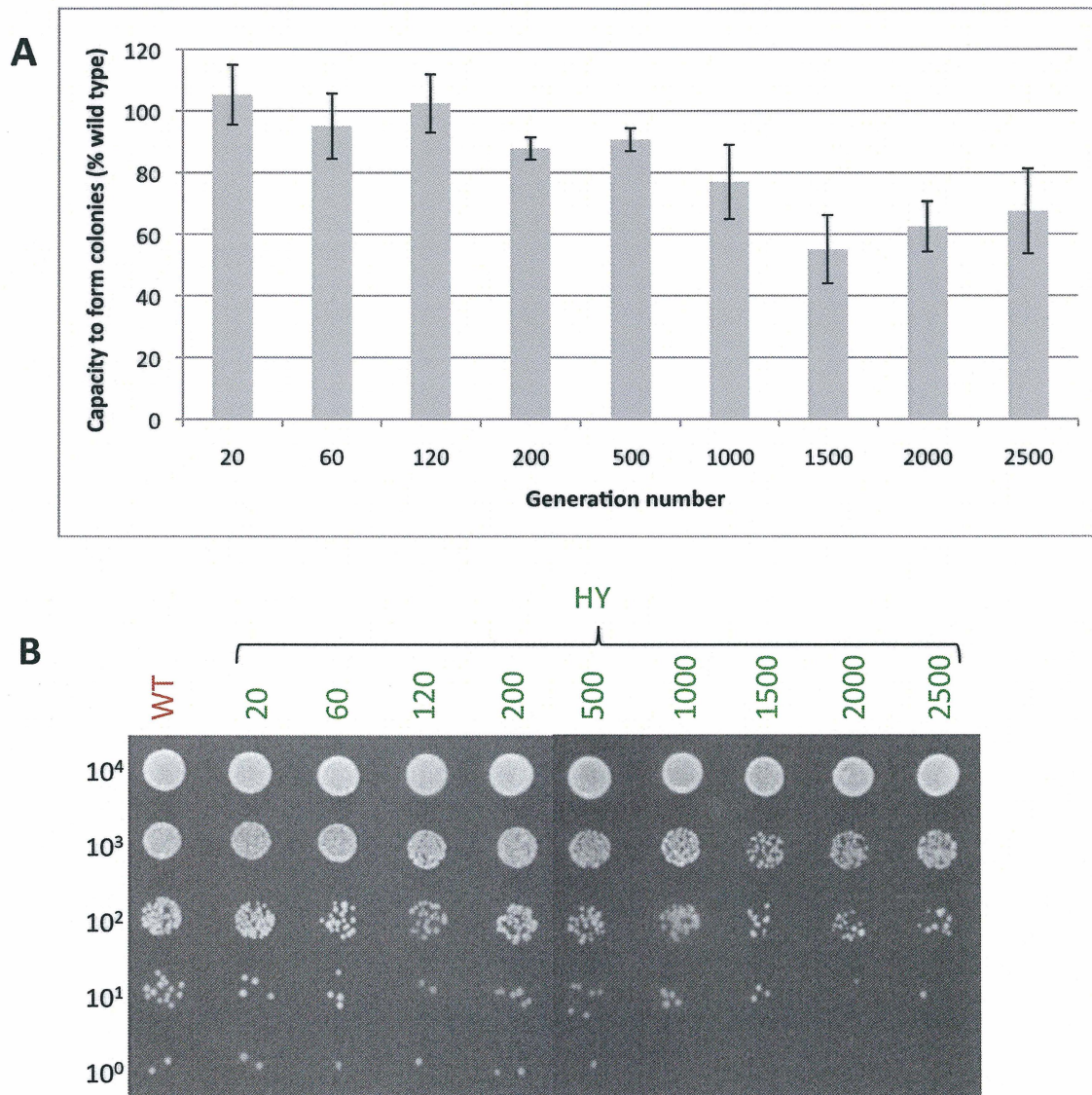


Figure 13: l'humanisation graduelle des télomères diminue la viabilité cellulaire
(A) La capacité à former des colonies de cellules humanisées à différentes générations est représentée en pourcentage par rapport aux cellules WT ajustées à 100%. **(B)** Une série de dilutions au 1/10^e de cellules WT et HY à différentes générations ont été déposées sur milieu YC-T-L Glc et incubé 2 jours à 30°C.

Les répétitions télomériques humaines distales sont responsables de l'activation des points de contrôle

Chez la levure à bourgeon, dès que des perturbations au niveau de l'ADN sont détectées, le signal de dommage est propagé jusqu'à la protéine effectrice Rad53p qui est

phosphorylée. Nous avons donc vérifié si

les répétitions humaines au niveau des télomères étaient reconnues comme un dommage par la cellule de levure.

L'analyse des extraits protéiques de cellules WT et humanisées à 60G par western blot anti-Rad53p révèle une forme unique de la protéine Rad53p qui

est non phosphorylée dans les deux cas

(figure 14, pistes 1 et 2) : les répétitions

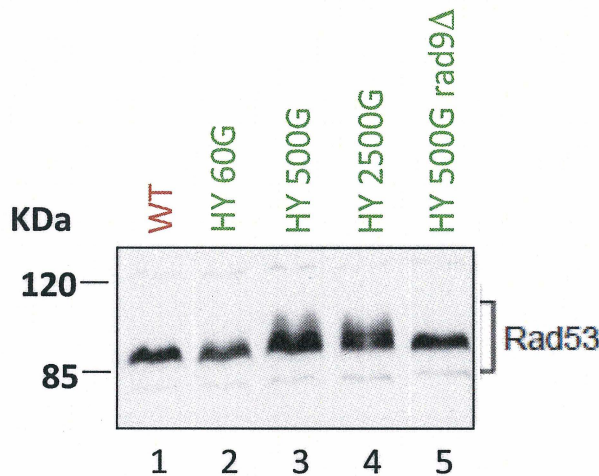


Figure 14: activation de Rad53p chez les levures humanisées aux générations avancées
Western blot anti-Rad53p à partir d'extraits protéiques de cellules humanisées à différentes générations.

télomériques levures de la souche WT ne sont pas reconnues comme un dommage tout comme l'ajout des premières répétitions télomériques humaines n'est pas suffisant pour activer Rad53p. Chez les extraits protéiques de cellules humanisées aux générations 500 et 2500, il y a apparition de la forme phosphorylée de Rad53p (figure 14, pistes 3 et 4) : la présence de répétitions humaines au niveau de tous les télomères active Rad53p ce qui est synonyme de dommage pour la cellule. Finalement la délétion *rad9Δ* chez la levure humanisée à 500G empêche la phosphorylation de Rad53p précédemment observée (figure 14, piste 5) : l'activation de Rad53p est dépendante de Rad9p.

Les répétitions télomériques humaines à la fin des chromosomes de levure sont donc reconnues comme un dommage par la cellule. Ces résultats sont partiellement en accord avec les travaux du Dr Ascenzioni (di Domenico et al., 2009) qui montre que Rad53p est activé de façon constitutive soit dès l'apparition des premières répétitions télomériques humaines aux extrémités des chromosomes de levure. Le fait qu'un autre type de cellules humanisées (fond W303) soit utilisé dans leur étude pourrait être une explication.

La différence entre une levure humanisée aux générations précoces par rapport à une levure humanisée aux générations avancées est la quantité de répétitions télomériques humaines aux extrémités des chromosomes de la levure, et particulièrement la quantité de simple brin télomérique humain (Bah et al., 2004, figure 1A et 1B). Pour déterminer si le simple brin télomérique humain était le signal structural responsable de l'activation de Rad53p, nous avons rétabli une extrémité télomérique levure chez la levure humanisée par échange de plasmides (pTLC1hTRP étant remplacé par pAZ1 qui contient la composante WT de *TLC1*). Nous avons donc «levurisé» nos levures humanisées. L'hybridation dans des conditions natives avec une sonde $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$ est en accord avec les résultats précédemment publiés (Bah et al., 2004) où l'avancement dans les générations des levures humanisées coïncide avec une augmentation du simple brin télomérique humain (figure 15 HY 60G à 2500G). Dans les levures humanisées où pAZ1 est la seule matrice ARN présente dans la cellule, il y a absence totale de signal ce qui se traduit par l'absence de simple brin télomérique humain (figure 15 HY 500G TG₁₋₃, HY 1000G TG₁₋₃). L'absence de simple brin télomérique T₂AG₃ dans ces souches concorde avec la nouvelle acquisition de simple brin télomérique TG₁₋₃ (figure 15). L'hybridation dans des conditions dénaturantes avec les sondes $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$ et $^{32}\text{P}(\text{C}_{1-3}\text{A})$ révèle la présence de blocs

télomériques humain et levure respectivement dans ces souches où les répétitions $[C_{1-3}A/TG_{1-3}]$ seraient distales et $[C_3TA_2/T_2AG_3]$ rendues internes.

De façon à confirmer l'ordre d'agencement de ces répétitions télomériques, nous avons eu recours au clonage et séquençage des télomères de ces souches humanisées «levurisées» (figure 16). Le résultat de séquençage confirme la configuration en sandwich des répétitions télomériques chez la levure humanisée «levurisée» à savoir : les répétitions humaines $[C_3TA_2/T_2AG_3]$ se retrouvent entre les répétitions internes levures $[C_{1-3}A/TG_{1-3}]$ et distales $[C_{1-3}A/TG_{1-3}]$ nouvellement ajoutées par la télomérase. On peut noter que la taille du télomère redevient à une longueur normale observée dans une souche sauvage.

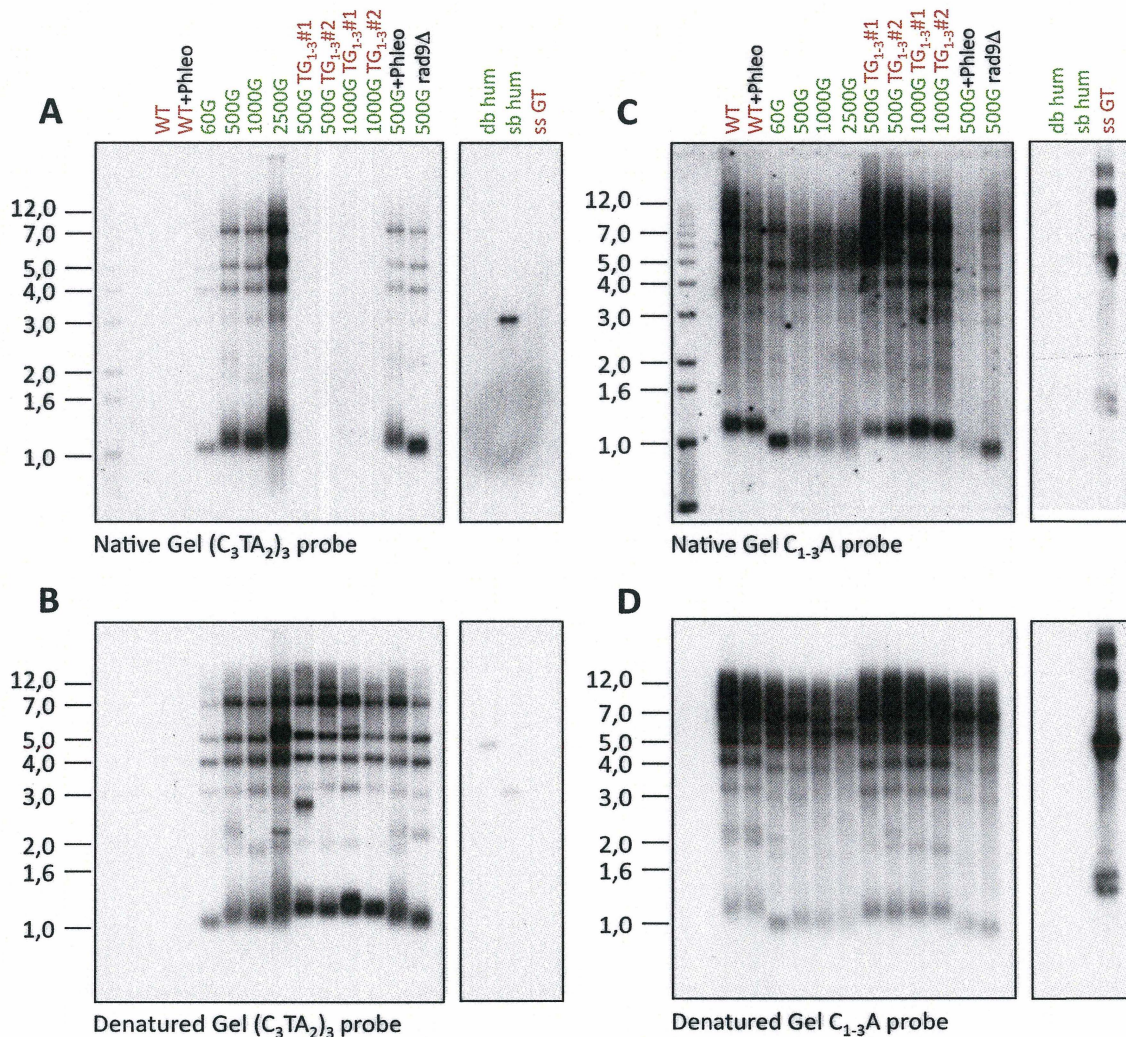


Figure 15 : structure des télomères de levures humanisées «levurisées»

L'ADN génomique de souches WT (pTLC1TRP), humanisées (pTLC1hTRP) et humanisées «levurisées» (initialement pTLC1hTRP mais remplacé par pAZ1 (TLC1, URA3)) a été isolé et digéré avec *Xho*I. Les fragments ont été séparés sur gel agarose 0.75% TBE et analysés dans un premier temps dans des conditions non dénaturantes (hybridation directe dans le gel ou In Gel, Dionne et Wellinger, 1996). **(A)** Le gel non dénaturant a été d'abord hybridé avec une sonde télomérique humaine radiomarquée $^{32}P(C_3TA_2)_3$ pour visualiser le simple brin télomérique humain. **(B)** Le même ADN montré en (A) a été ensuite dénaturé et hybridé de nouveau avec la sonde $^{32}P(C_3TA_2)_3$ pour visualiser l'ADN télomérique humain total. Les mêmes ADN analysés en (A) et (B) ont été migrés en parallèle sur un autre gel et hybridés dans des conditions natives et dénaturantes avec une sonde télomérique levure $^{32}P(C_{1-3}A)$ pour visualiser le simple brin télomérique levure **(C)** et l'ADN télomérique levure total **(D)** respectivement. Les pistes sb hum, db hum et ssGT correspondent respectivement aux contrôles d'hybridations de l'ADN télomérique humain simple brin, double brin et l'ADN télomérique levure simple brin (Bah et al., 2004, LeBel et al., 2006).

Nous avons donc vérifié par western blot si dans les souches HY 500G TG₁₋₃ et HY 1000G TG₁₋₃ il y avait phosphorylation de Rad53p. Contrairement aux souches parentales humanisées (figure 17, pistes 4 et 5) où Rad53p est activée, les mêmes souches mais avec une extrémité télomérique levure n'engendrent plus de phosphorylation de Rad53p (figure 17, pistes 8 et 9).

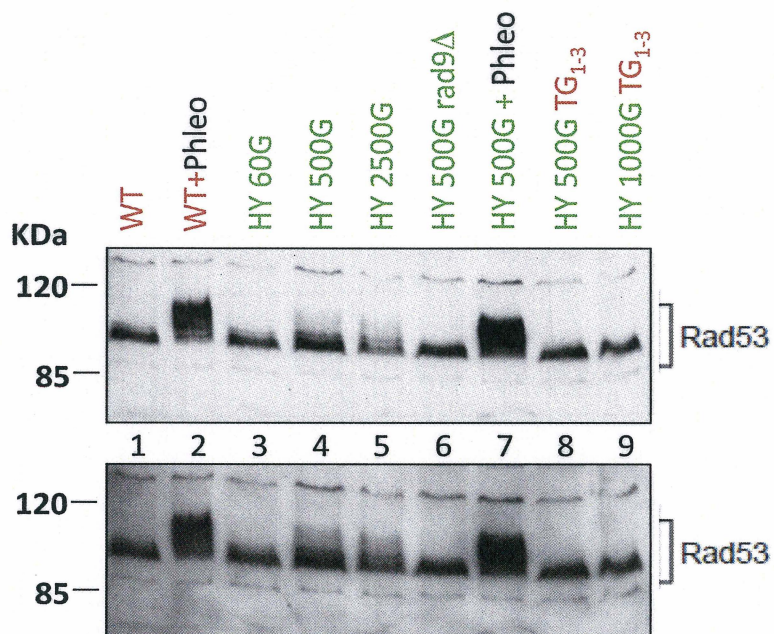
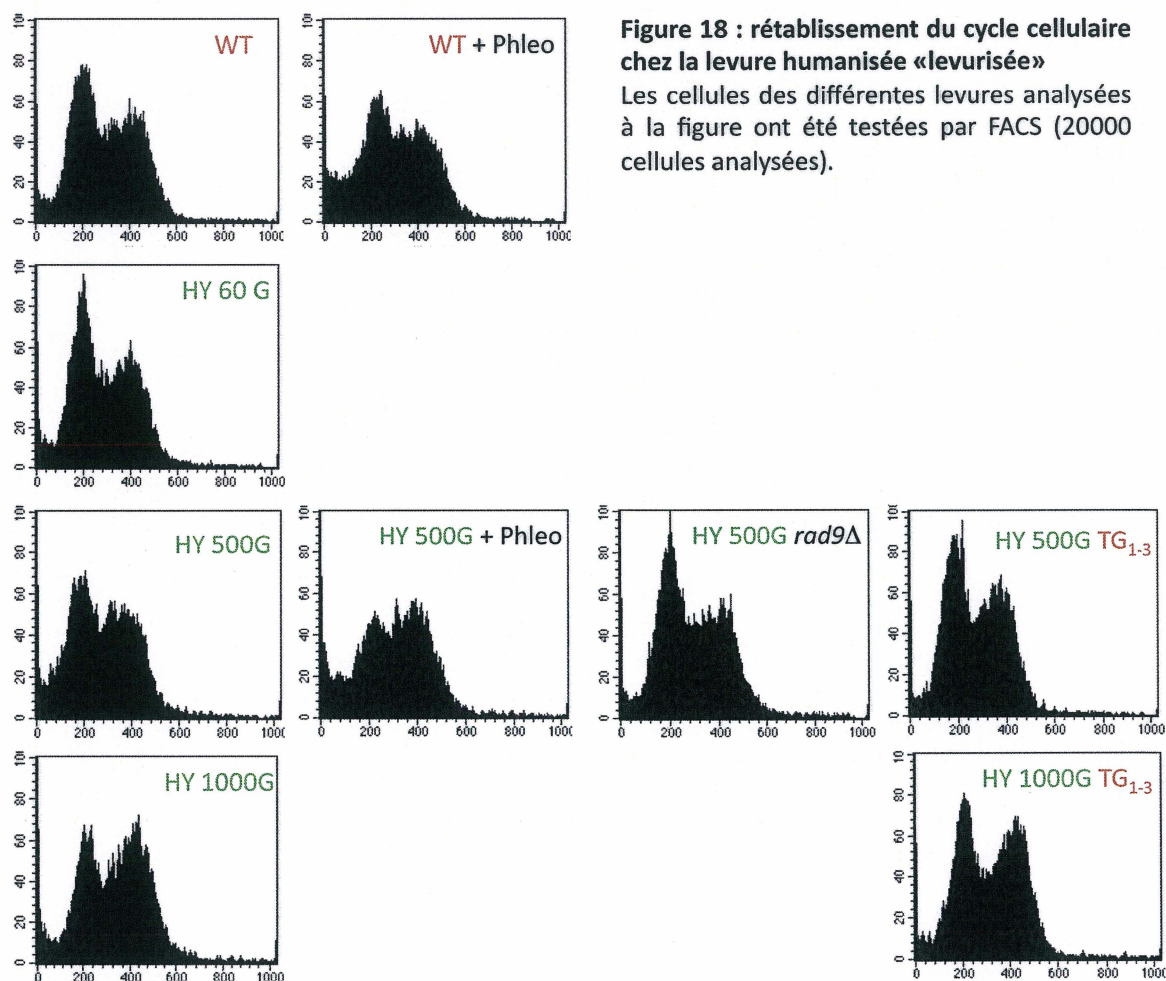


Figure 17 : le simple brin télomérique humain activerait Rad53p
Western blot anti-Rad53p à partir d'extraits protéiques de cellules WT (pistes 1 et 2), humanisées à différentes générations (pistes 3 à 6) et de cellules humanisées "levurisées" (pistes 8 et 9). haut: exposition 20 min, bas: exposition sur la nuit.

De cette analyse western blot anti-Rad53p on peut donc en déduire que les répétitions télomériques humaines au bout des chromosomes de levure activent les points de contrôle et sont donc reconnues comme un dommage par la cellule. Bien que le résultat ne soit pas directement prouvé dans cette expérience, on pourrait penser

que le long simple brin télomérique humain serait l'élément détecté comme un dommage par la cellule, car l'activation de Rad53p n'est effective que chez les levures humanisées à 500 Gén. et plus qui ont un long simple brin T₂AG₃ alors qu'à 60 Gén. où peu de simple brin est présent il n'y a pas de phosphorylation de Rad53p. Les analyses FACS de ces cellules viendraient appuyer cette hypothèse où les points de contrôle sont «ON» chez les levures avec des répétitions distales [C₃TA₂/T₂AG₃] plus un long simple brin T₂AG₃ (figure 18, délai en G2/M chez HY 500G et

HY 1000G), et «OFF» chez les levures avec des répétitions internes [C_3TA_2/T_2AG_3] ou avec peu de simple brin T_2AG_3 (figure 18, pas de délai G2/M chez HY 500G TG_{1-3} , HY 1000G TG_{1-3} et HY 60G).



CHAPITRE II

Instabilité génomique chez la levure humanisée

Préambule

L'analyse FACS de cellules humanisées aux générations 1000 et plus, a révélée un contenu en ADN supérieur à 2N après réplication, ce qui suggère un gain de séquences ADN en plus des 16 chromosomes que la cellule a héritée. Les réarrangements chromosomiques sont une marque d'instabilité au niveau du génome, et nous avons vérifié par des méthodes directes et indirectes si la présence des télomères humanisés chez la levure générerait de tels événements.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches utilisées

Les souches haploïdes RWY12 + pTLC1TRP (WT) et RWY12 + pTLC1hTRP (HY) à différentes générations ont été utilisées pour étudier l'instabilité génomique.

La délétion des gènes *RAD9*, *EXO1*, *TEL1*, *LIG4*, *RAD50*, *POL4* et *LIF1* a été effectuée dans les souches indiquées (HY 500G : levure humanisée à 500 Gén. ; HY E : levure humanisée à

40 Gén. ; HY L : levure humanisée à 2500 Gén.) par remplacement complet de l'ORF par une cassette natMX4 conférant la résistance à la drogue ClonNAT.

Extraction ADN, détection de l'ADN télomérique (voir chapitre I)

Sondes utilisées

Name	Original Plasmid	Fragment liberated with	Description	Reference
ADE2	pRS422	EcoRV + StuI	645 bp of ADE2 sequence	Brachmann et al. 1998
CEN IV	YcpA11	XhoI	1.2 Kb of CEN IV sequence	Gietz and Sugino, 1988
X	YRp120	NcoI	1.7 Kb of X sequence	Chan and Tye, 1983
Y'	pVZY'K	KpnI	600 bp of Y' sequence	Louis and Haber, 1990
(C ₃ TA ₂) ₃	oligo	—	CCCTAACCCCTAACCCCTAA	Bah et al., 2004
C ₁₋₃ A	oligo	—	CCCACCACACACCCACACCC	Bah et al., 2004

Tableau 3 : sondes utilisées

Amplification des fusions télomère-télomère

Les méthodes décrites par Pardo et Marcand, 2005 et 2006, ont été utilisées avec quelques modifications. Les amorces HindIII-X2 (cgCAGCTTTGTGGTGGTGGGATTAGAGTGGTAG) et EcoRI-Y'2 (cgGAATTCTTAGGGCTATGTAGAAGTGCTG) ont été utilisées pour l'amplification et le clonage des fusions télomère-télomère. Les réactions PCR ont été effectuées dans un volume de 30 µL comprenant ~100 ng d'ADNg, 1X de tampon HotStarTaq contenant 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de chaque dNTP, 0,6 µM de chaque amorce, 2.5 unités de HotStarTaq DNA polymerase (QIAGEN). Les conditions de réaction sont les suivantes : 15 min de dénaturation initiale à 95°C, suivi de 35

cycles de 30 sec à 94°C, 1 min à 60°C, 1 min 30 sec à 72°C, pour finir avec 5 min à 72°C. Les produits ont été migrés sur un gel agarose TBE 1%. Pour contrôler l'efficacité de la réaction PCR pour chaque échantillon d'ADN, les amorces ARO1+ (TGACTGGTACTACCGTAACGGTTC) et ARO1- (GAATACCATCTGGTAATTCTGTAGTTTTGAC) ont été utilisées pour amplifier un fragment de 371 pb correspondant à l'ORF du gène non télomérique ARO1. Le mix PCR a été préparé selon la méthode ci-dessus mais avec les amorces ARO+ et ARO-. Les conditions de réaction sont les suivantes : 5 min à 94°C, suivi de 25 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 60°C, 30 sec à 72°C, puis 5 min à 72°C. 1/10^e de ces produits de réaction ont été ajouté au 30 µL de réaction de fusions et migrer sur un même gel.

Clonage et séquençage des fusions télomère-télomère

Les produits de la réaction PCR (30 µL) ont été purifiés sur colonne QIAGEN (QIAquick PCR Purification Kit), digérés avec les enzymes HindIII et EcoRI, et ligués sur la nuit à 16°C avec le vecteur pUC19 digéré HindIII et EcoRI. Les produits de ligation ont été transformés dans les bactéries TOP10, et les transformants ont été sélectionnés sur milieu LB Amp + XGal + IPTG. Les colonies blanches (positives) résultantes ont été cultivées sur la nuit à 26 °C, l'ADN plasmidique extrait de ces cellules (QIAprep Spin Miniprep Kit), analysés par restriction et envoyés pour séquençage avec les amorces M13F (GTAAAACGACGGCCAGT) et M13R (GCGGATAACAATTCACACAGG). Étant donné la nature des répétitions télomériques (GC riche) et le fait que les fusions télomère-télomère engendrent des séquences palindromiques quasi parfaites, ces structures secondaires sont donc très difficiles à séquencer et requiert l'emploi dGTP et l'ajout de bétaine lors de la réaction de séquençage.

Gel d'électrophorèse à champs pulsés (CHEF gel)

La séparation des chromosomes de levures sauvages et humanisées a été effectuée selon (Schwartz et Cantor, 1984 et Maringele et Lydall, 2006 avec quelques modifications. Les différentes souches ont été poussées dans 50 mL YC-TRP-LEU Glc à 30°C jusqu'à une OD_{660nm} de ~1.04 (2×10^7 cellules/mL) soit un total de 1×10^9 cellules. Les cellules ont été lavées 2 fois avec 50 mM EDTA pH 8 glacé et resuspendues à 1×10^9 cellules/mL dans cette même solution. 600 µL de cette suspension de cellules a été mixé avec 200 µL de solution 1 (1 mL SCE [1M sorbitol, 0.1M sodium citrate, 0.06M EDTA pH8], 50 µL β-mercaptoéthanol, 1 mg zymolyase 100T), et incubée à 37°C pour 60 min. Cette suspension de cellules a été mélangée à 500 µL d'agarose à faible température de fusion (2% agarose dans 125 mM EDTA pH 8) refroidie à 50°C pour donner une concentration finale d'agarose de 0.75%. Cette suspension «cellules-agarose» a été placée dans des moules et refroidie à 4°C pendant 20 min. Les échantillons «cellules-agarose» ont été placés dans des boîtes de pétris (35 X 10 mm) et incubés 24h à 37°C dans 1.5 mL de solution 2 (0.5M EDTA pH 8, 10mM Tris-Cl pH 7.5, 7.5% β-mercaptoéthanol). Les échantillons «cellules-agarose» ont été lavés 3 fois 15 min à température pièce dans 50 mM EDTA pH8, et ensuite incubés 24h à 50°C dans 1.5 mL de solution 3 (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 0.5M EDTA pH 8, 1% sarkosyl, 1 mg/mL protéinase K). Les échantillons «cellules-agarose» ont été lavés une fois 15 min à température pièce dans 50 mM EDTA pH8, puis de nouveau pendant 16h. Finalement, les «cellules-agarose» ont été lavés une fois 15 min à température pièce dans 50 mM EDTA pH8, puis conservées à 4°C dans cette même solution pour au moins 1 mois. Pour chaque échantillon, les blocs «cellules-agarose» emprisonnant les chromosomes ont été chargés sur gel d'agarose 1% TBE 0.5X et migrés dans du TBE 0.5X à 200 Volts à 14°C avec changement de

temps de 60 sec pendant 30h suivi d'un changement de temps de 90 sec pendant 18h. Après migration le gel a été photographié après une immersion de 20 min dans une solution de BET suivi de 4 lavages d'1h dans de l'eau distillée. Le gel a été ensuite dénaturé et transféré sur une membrane Hybond XL (GE Healthcare), et hybridé avec différentes sondes (tableau 3).

RÉSULTATS

Les levures humanisées aux générations 2000 et 2500 acquièrent des fusions télomère-télomère (T-T).

Par buvardage de type southern nous avons pu visualiser directement les fusions télomère-télomère chez les levures humanisées. Celles-ci sont présentes seulement chez les cellules ayant accumulées plus de 2000 Gén., alors qu'aux générations inférieures aucune bande de fusion n'est détectée sur gel (figure 19A, flèches). L'hybridation avec des sondes de différentes natures a permis de révéler que plusieurs séquences étaient impliquées dans les fusions entre télomères : les télomères Y' (figure 19A) et les télomères X (figure 19B) sont engagés dans les fusions. Étant donné la taille de la bande de fusion télomère-télomère d'environ 2.2 – 2.4 Kb, il n'est pas à exclure que des fusions entre télomères Y'-Y', X-Y' et X-X aient lieu. De plus, à la jonction de ces fusions télomère-télomère il semblerait y avoir aussi bien des répétitions télomériques humaines (figure 19C) que des répétitions télomériques levures (figure 19D). Finalement, la délétion de certains gènes requis pour le NHEJ (*LIG4*, *RAD50*, *POL4*, *LIF1*) dans une levure humanisée à 2500 Gén., laisse toujours apparaître cette bande de fusions ce qui suggère que les fusions télomère-télomère dans ces souches ont été stabilisées au niveau du génome (figure 19).

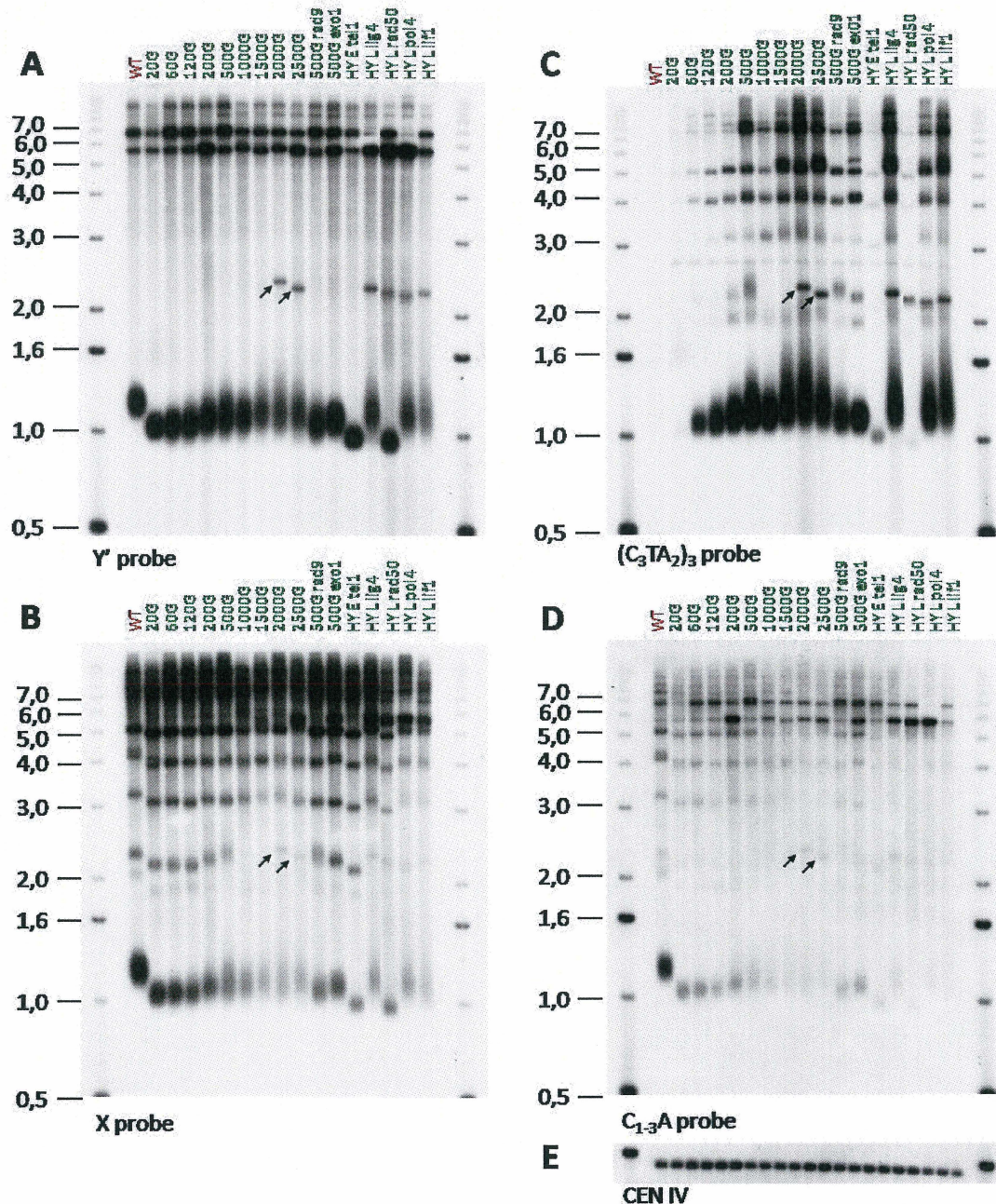


Figure 19 : visualisation directe sur gel des fusions telomere-telomere chez les levures humanisées. L'ADN génomique de souches **WT** (pTLC1TRP), **humanisées** (pTLC1hTRP) a été isolé et digéré avec *XhoI*. Les fragments ont été séparés sur gel agarose TBE 0.9%, ensuite dénaturés et transférés sur membrane Hybond XL (GE Healthcare) puis analysés par hybridation avec différentes sondes. (A) Sonde sous télomérique Y'. (B) Sonde sous-télomérique X. (C) Sonde télomérique humaine $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$. (D) Sonde télomérique levure $^{32}\text{P}(\text{C}_{1-3}\text{A})$. (E) Sonde centromérique CEN IV. La délétion des gènes RAD9 et EXO1 a été faite dans une levure humanisée à 500 Gén., TEL1 dans HY à 40 Gén. et TEL1, LIG4, RAD50 et LIF1 dans HY à 2500 Gén. Les flèches indiquent les fusions telomere-telomere aux générations 2000 et 2500.

La méthode PCR révèle des fusions télomère-télomère chez la levure humanisée aussitôt que 1000 Gén.

La méthode PCR d'amplification des fusions télomère-télomère développée par Pardo et Marcand, 2005, 2006, nous a permis de détecter les fusions et d'apprécier les séquences télomériques à la jonction s'il y a.

L'amplification PCR utilisant une amorce dans la région sous-télomérique Y', et une autre dans la région sous télomérique X, toutes deux proches des premières répétitions télomériques, à partir d'ADNg de souches humanisées à différentes générations, révèle un produit pour les générations 1000, 1500, 2000 et 2500, alors que pour les générations 500 et moins tout comme pour le contrôle WT, il n'y a pas de produit d'amplification (figure 20). Le clonage de ces produits PCR dans le vecteur pUC19 et le séquençage du plasmide dans les 2 sens confirme que ces produits sont bel et bien des fusions télomère-télomère : 2 exemples de résultats de séquençage d'une fusion télomère-télomère chez la levure humanisée à 2000 Gén. et 2500 Gén. sont illustrés à la figure 21. Aussi bien des répétitions télomériques levures que humaines sont engagées dans ces fusions T-T, ce qui est en accord avec les résultats sur gel de la figure 19. Plus en détail, on peut observer que la fusion se fait toujours entre un télomère X qui a très peu de répétitions TG₁₋₃ avec un télomère Y' qui a plus de 100 pb de répétitions TG₁₋₃. La jonction proprement dite de la fusion concerne toujours les répétitions T₂AG₃ distales. Le passage à travers les fusions T-T par les polymérases est rendu pratiquement impossible due à la nature palindromique de ces séquences. L'arrêt brutal de la réaction de séquençage au niveau des répétitions T₂AG₃ laisse penser que les séquences à venir seraient C₃TA₂ de l'autre télomère engagé dans la fusion (voir chromatogrammes à l'annexe 2). C'est pourquoi cet arrêt

brutal devrait coïncider avec le point de fusion entre les 2 télomères alors que pour un télomère non fusionné, la polymérase est capable de passer facilement à travers 350 pb de répétitions télomériques $TG_{1-3} + T_2AG_3$ (voir figure 16C du chapitre I).

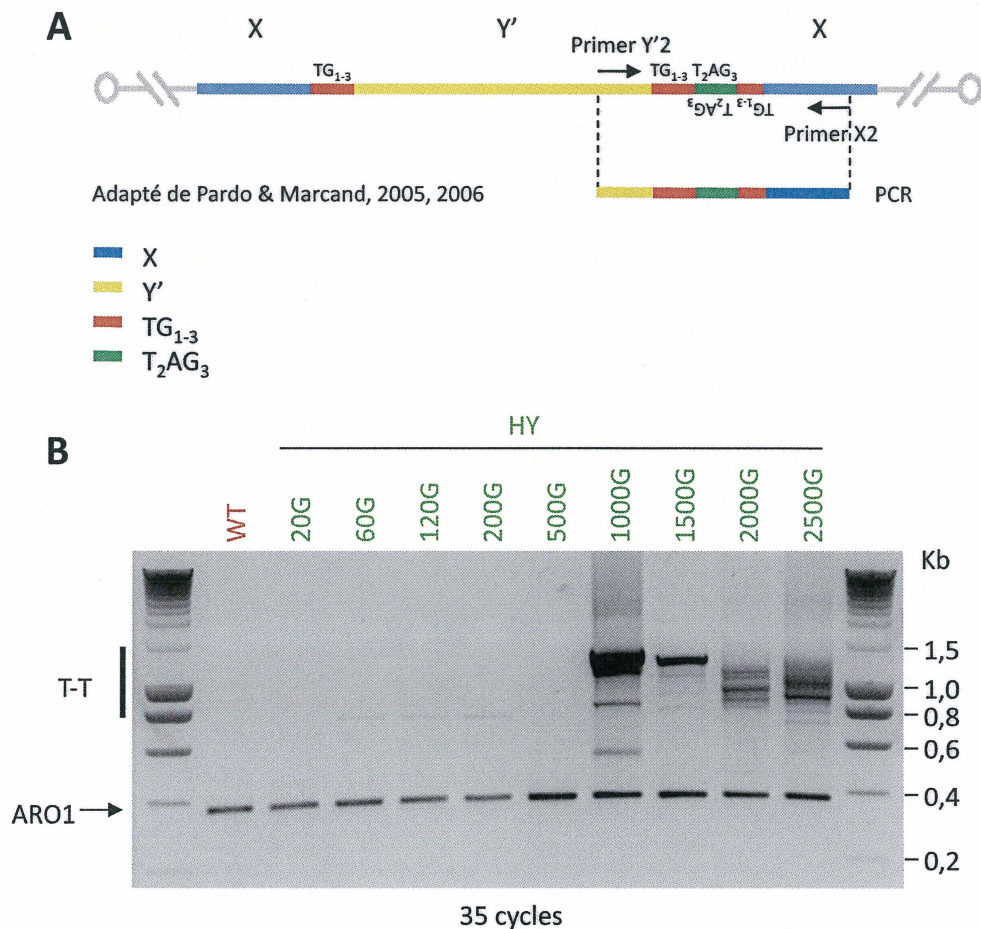


Figure 20 : fusions telomere-telomere chez les levures humanisées aux générations avancées.
(A) Représentation schématique d'une fusion entre un télomère humanisé Y' et un télomère humanisé X, et positionnement des amorces pour amplifier la fusion. Les amorces Y'2 et X2 se trouvent respectivement à 120 et ~340 pb des premières répétitions TG_{1-3} et l'amplification entre les 2 télomères devrait donner un produit de 460 pb plus les répétitions télomériques à la jonction. **(B)** Détection par PCR des fusions telomere-telomere (T-T) dans une souche WT et des souches humanisées à différentes générations.

A T-T HY 2000G

M13F primer (Y' telomere)

CTNNNTGTAGAGTCTGTAGGGCTAAAGAGCAGGGTTTCATTTTCATTTTTTTAATTCGGTCA
 GAAAGCCGGGTAAAGGAGTGACAGCGAGAGTAGAGGTAGATGTAAGAGAGTGTGGGTGTGGTGT TG₁₋₃ 117 nt
 GGGTGTGGTGTGTGGGTGTGGTGTGTGTGGGTGTGTGGGTGTGGGTGTGGTGTGGGTGTGGTGT T₂AG₃ 60 nt
 GTGGGTGTGGTGTGGGTGTGTGTGTGTGGGTGTGGGTGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
 TTAGGGTTAGGGTTNNGGTTAGGGTTAGGGTTNNGG - fusion point

M13R primer (X telomere)

CNGNNATGACATGATTACGCCAAGCTTTGTGGTGGTGGGATTAGAGTGGTAGGGTAAGTATATGT
 GTATTATTACGATCNTTGTAAACGTTTCAATATGGTGGGTGAACAACAGTATAGTGAGTAGCAG
 ATGGGGGATGGTAGGGTAATGGCAGGGTAAGTGGTAGTGGGGTTGGATATGGGTAATTGGAGG TG₁₋₃ 14 nt
 GTAACGGTTATGGTGGGCGGTGGTTAGTGGTAAGTAGAGAGATGGATGGTGGTTGGAGTTGTAG T₂AG₃ 94 nt
 AATGGAATGGAACAGGGTAACGAGTGGGGAGGTAGGGTAATGGAGGGTACGTTAAGAGACAGG
 TTTATCAGGGTTGGATTAGAATAGGGTTAGGGTAGTGTAGGGTAGTGTAGGGTAGTGTAGGGTAGTGTGGG
 TGTGGGTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAG
 GGTTNNGGTTAGGGTTAGGGTTANGGTTNNGGNTNNG - fusion point

B T-T HY 2500G

M13F primer (Y' telomere)

GGNNTGTAGAGTCTGTAGGGCTAAAGAGCAGGGTTTCATTTTCATTTTTTTAATTCGGTCAG
 AAAGCCGGGTAAAGGAGTGACAGCGAGAGTAGAGGTAGATGTAAGAGAGTGTGGGTGTGGTGT TG₁₋₃ 115 nt
 GGGTGTGGTGTGTGGGTGTGGTGTGTGTGGGTGTGTGGGTGTGGGTGTGGTGTGGGTGTGGTGT T₂AG₃ 59 nt
 GTGGGTGTGGTGTGGGTGTGTGTGTGGGTGTGGGTGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT
 AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGG - fusion point

M13R primer (X telomere)

AANNNTGANTACGCCAAGCTTTGTGGTGGTGGGATTAGAGTGGTAGGGTAAGTATATGTGTA
 TTATTTACGATTATTTGTTAACGTTTCAATATGGAGGATAGAACAACAGTACAGTGAGTAGGACATG
 GTGGATGGTAGGGTAATAGTAGGGTAATGGTAGTGGAGTTGGACATGGGTAATTGGAGGGTAAC TG₁₋₃ 24 nt
 GGTTATGGTGGACGGTGGATGGTAGTAGTAAGTAGAGAGATGGATGGTGGTTGGGAGTGGTATA T₂AG₃ 5 nt
 ATGAAATGGGACAGGGTAACGAGTGGGGAGGTAGGGTAATGGAGGGTACGTTAAGAGACAGGT
 TTGTCAGGGTTGGATTAGAATAGGGTTAGGGTAGTGTAGGGTAGTGTAGGGTAGTGTAGGGTAGTGTGGTGTG
 GTGTGTGGGTGTGGGTAGG - fusion point

Figure 21 : des répétitions télomériques levures et humaines sont engagées à la jonction des fusions télomère-télomère.

Résultat de séquençage d'une fusion telomere-telomere chez la levure humanisée à 2000 Gén. (A) et 2500 Gén. (B). Les séquences identifiées sont dans l'ordre en bleu : amorce M13F ou M13R, noir en italique : séquence Y' ou X, rouge : répétitions télomériques levures, vert : répétitions télomériques humaines, bleu : amorce dG₁₈-BamHI. La séquence en noire au début du télomère X correspond au plasmide vecteur pUC19.

Réarrangements chromosomiques chez les levures humanisées aux générations 1000 et plus.

La méthode de séparation des chromosomes par électrophorèse à champs pulsés permet de distinguer tous les chromosomes de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Une photographie du gel prise après exposition au bromure d'éthidium (figure 22A), ou l'hybridation des séquences sous-télomériques X présentes sur tous les télomères avec une sonde X (figure 22C), nous permet de visualiser les 16 chromosomes de la levure, qui varient entre 200 et 1500 Kb. Par comparaison avec le profil de séparation des chromosomes issus d'une souche sauvage (WT), on peut observer un remaniement des chromosomes chez les levures humanisées aux points 1000, 1500, 2000 et 2500 Gén. Il semblerait que ces 4 souches aient perdues un chromosome au niveau du triplet XII, IV et XV (figure 22C). Surement le chr. XII serait le manquant car les hybridations ADE2 (locus génomique au chr. XV) et CEN IV (centromère du chr. IV), montrent respectivement que les chr. XV et IV sont toujours présents (figures 22B et 22E). Aux points 1000 et 1500 Gén., les chr. XVI et XIII sont absents et on voit l'apparition d'un chr. réarrangé à une nouvelle position juste au dessus de ce doublet de chr. manquant (figures 22C et 22D). Au point 2000 Gén., l'organisation est similaire à celle d'une souche WT à part le chr. XII manquant (figures 22C et 22D). Au point 2500 Gén., le chr. XVI est absent et on voit le nouveau chr. réarrangé juste au dessus du chr. XVI manquant. L'hybridation avec la sonde Y' indique la présence d'élément sous-télomérique Y' au nouveau chr. réarrangé (figure 22D). L'hybridation avec les sondes ADE2 et CEN IV indique que ni le télomère marqué ADE2 au chr. V-R, ni le chr. IV sont engagés dans des remaniements de chromosomes. Finalement, il n'est pas à exclure que des chromosomes réarrangés, notamment par

l'intermédiaire des fusions T-T, n'ont pas pu être séparés dans le gel dû à leurs grandes tailles.

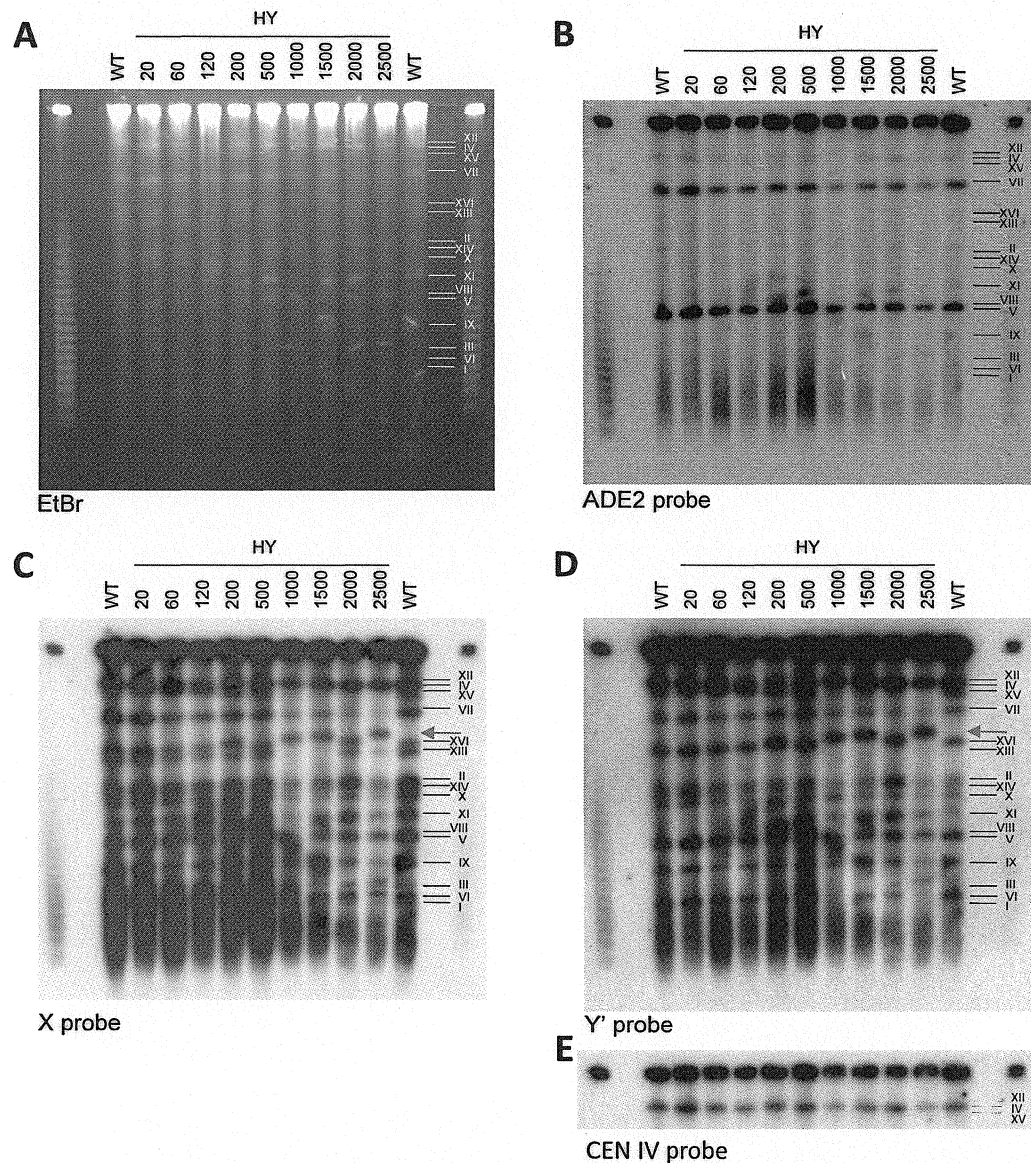


Figure 22 : réarrangements chromosomiques chez les levures humanisées aux Gén. 1000 et plus.

Les chromosomes de souches WT et humanisées à différentes générations ont été isolés (voir Matériels et Méthode) et séparés sur gel d'électrophorèse à champs pulsés (Schwartz et Cantor, 1984). Le gel a été transféré dans des conditions dénaturantes sur une membrane de nitrocellulose Hybond XL (GE Healthcare), et hybridé avec différentes sondes. **(A)** Photographie du gel d'électrophorèse après migration et exposition au Bromure d'Éthidium. **(B)** Hybridation avec une sonde ADE2. **(C)** Hybridation avec une sonde sous-télomérique X. **(D)** Hybridation avec une sonde sous-télomérique Y'. **(E)** Hybridation avec une sonde centromérique CEN IV. Le numéro des 16 chromosomes est indiqué à droite des gels. La flèche indique un chromosome réarrangé à une nouvelle position.

Par buvardage de type southern, amplification PCR des fusions T-T et séparation des chromosomes par CHEF gel, nous avons mis en évidence une réorganisation des chromosomes chez la levure humanisée ayant accumulée 1000 Gén. ou plus, ce qui confirme les résultats de cycle cellulaire au chapitre I où le contenu en ADN des levures humanisées à partir de 1000 Gén. était supérieur à 2N. L'humanisation avancée des télomères confère de l'instabilité génomique chez la levure.

CHAPITRE III

Rôle de la télomérase dans la réplication des télomères humanisés

Préambule

L'ajout *de novo* d'ADN télomérique aux extrémités des télomères par la télomérase permet la réplication complète des chromosomes par la machinerie de réplication conventionnelle. Cette structure terminale joue un rôle de masque en empêchant le déclenchement des points de contrôle et des événements inappropriés de réparation d'ADN. Or dans les chapitres précédents nous avons vu que la prévention de ces deux événements était compromise par la présence des répétitions télomériques humaines. Dans ce chapitre nous avons vérifié si également la réplication était affectée par la présence des séquences humaines, et quelle était l'implication de la télomérase dans ce processus.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches utilisées

Name	Genotype	Origin or comments
C6.1	Mat a/Mat α tlc1h/TLC1 ade2-1/ade2-101 can1-100/CAN lys2-1/lys2-801 trp1/trp1 Δ 63 ura3/ura3-52 his5-u/HIS5 his3- Δ 200/HIS3 leu2- Δ 1/LEU2 kar1- Δ 15/KAR1 cyh2 ^R /cyh2 ^S	Henning et al., 1998
a3	Mat a ade2 lys2 trp1 ura3 his3 his5 LEU2 TLC1	spore from C6.1
g2	Mat a ade2 lys2 trp1 ura3 his3 his5 leu2- Δ 1 tlc1h	spore from C6.1
g2tetO ₂ -tlc1h	Mat a ade2 lys2 trp1 ura3 his3 his5 leu2- Δ 1 tetO ₂ (tlc1h)::KanMX4	g2 transformed with tetO ₂ (tlc1h)::KanMX4
a3 frag	Mat a TLC1 ade2 lys2 trp1 ura3 his3 his5 LEU2 adh4::URA3TELVIIL	a3 fragmented with pHuman tel
g2 frag	Mat a tlc1h ade2 lys2 trp1 ura3 his3 his5 leu2- Δ 1 adh4::URA3TELVIIL	g2 fragmented with pHuman tel
BY4705	Mat a/Mat α ade2 Δ ::hisG/ade2 Δ ::hisG his3 Δ 200/his3 Δ 200 leu2 Δ 0/leu2 Δ 0 lys2 Δ 0/lys2 Δ 0 met15 Δ 0/met15 Δ 0 trp1 Δ 63/trp1 Δ 63 ura3 Δ 0/ura3 Δ 0	Brachmann et al., 1998

Tableau 4 : souches utilisées

Plasmides utilisés

Name	Description	Reference
pCM224	Amplification of the KanMX4-tTA-ADH1 _t -tetO ₂ cassette	Belli et al., 1998
pSH380	empty vector control, pRS315-derived CEN plasmid	Vega et al., 2007
pVS45	pSH380-GAL-PIF1, Pif1p under control of the GAL1 promoter	Vega et al., 2007
pGPKA	pSH380-GAL-pif1K264A, inactivates the ATPase/helicase activity of Pif1p	Vega et al., 2007
pRS316-EST2	pVL291, BamHI EST2 fragment cloned into YcPlac33/BamHI	Gift of V. Lundblad
pRS316-CDC13-EST2	Sall-NotI CDC13-EST2 fragment from pVL1107 cloned into pRS316/Sall-NotI	Bah et al., 2009
pRS415	LEU2, CEN6, ARSH4 plasmid	Sikorski and Hieter, 1989
pRS415-EST2	BamHI EST2 fragment from pVL291 cloned into pRS415/BamHI	Bah et al., 2009
pRS415-est2D670A	Sall-SmaI est2D670A fragment from pVL726 cloned into pRS415/Sall-SmaI	Bah et al., 2009
pRS415-CDC13-EST2	pVL1107, CDC13-EST2 fusion derived from pRS415	Evans and Lundblad, 1999
pRS415-CDC13-est2D670A	pVL1111, CDC13-est2D670A fusion derived from pRS415	Evans and Lundblad, 1999
pAG25	plasmid containing the nourseothricin resistance cassette (natMX4)	Goldstein and McCusker, 1999

Tableau 5 : plasmides utilisés

Oligonucléotides utilisés

Name	Sequence 5' to 3'	Use
PROTCL1-DEL-FOR	GCAATGGTGACATATAGATCTCAAGGTTCTC AATTAAGACCGcactgaagcttcgtacgc *	One-step substitution of the <i>tlc1h</i> promoter
PROTLC1-DEL-REV	ACAGCCATTGACATTTTCATAGGGTACCTAT CTTCCTCTCataggccactagtgatctg	
-201-182-TLC1	GGAAGAGCAATCCTGCTAAAG	Confirmation of <i>tlc1h</i> promoter substitution
KANB	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT	
MRC1-NAT-FOR	TCGTTATTCGCTTTTGAACCTATCACCAAATA TTTTAGTGCCAGCTGAAGCTTCGTACGC **	Disruption of MRC1 ORF with natMX4 cassette
MRC1-NAT-REV	CTGGAGTTCAATCAACTTCTTCGAAAAGAT AAAAAACAGGCCGATTCATTAATGCAGG	
RRM3-NAT-FOR	AGCTCAAAAGTCGAGAGATTGTTCTTATAA GACATCCCGCCAGCTGAAGCTTCGTACGC	Disruption of RRM3 ORF with NatR cassette
RRM3-NAT-REV	GAAAACTTCAACTAGAGTATATGCATTTATT CGTTGCAA GGGCCGATTCATTAATGCAGG	
RAD52-NAT-FOR	AAGAACTGCTGAAGGTTCTGGTGGCTTTGGT GTGTTGTTGCCAGCTGAAGCTTCGTACGC	Disruption of RAD52 ORF with natMX4 cassette
RAD52-NAT-REV	AATGATGCAAATTTTTTATTTGTTTCGCCAG GAAGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGG	
* la séquence du site de clonage multiple de pCM224 est indiquée en lettres minuscules		
** la séquence du site de clonage multiple de pAG25 est indiquée en lettres italiques		
Tableau 6 : oligonucléotides utilisés		

Construction de la souche *g2tetO₂-tlc1h*

La souche humanisée *g2*, qui contient la matrice ARN humanisée de *TLC1* au niveau du génome, a été utilisée pour contrôler l'expression de *tlc1h* en substituant son promoteur original par un promoteur régulable par la doxycycline. La cassette KanMX4-tTA-ADH1_t-tetO₂ a été amplifiée à partir du plasmide pCM224 dans un volume final de 50 µL comprenant, 10 ng de pCM224, 200 µM de chaque dNTP, 1X tampon Expand HF, 500 nM pour chaque amorce PROTCL1-DEL-FOR et PROTCL1-DEL-REV, 5.25U Expand High Fidelity (Roche). Les conditions de réaction étaient les suivantes : 4 min de dénaturation initiale à 94°C, suivi de 35 cycles de 30 sec

à 94°C, 45 sec à 55°C, 4 min à 68°C, pour finir avec 7 min à 68°C. Une bande ~4 Kb était observée sur un gel d'agarose TAE 0.7%. La réaction PCR a été purifiée sur colonne QIAGEN (QIAquick PCR Purification Kit), et transformée dans la souche g2. Après sélection sur milieu G418, l'intégration de la cassette au bon locus a été vérifiée par PCR directement sur les colonies en utilisant les amorces -201-182-TLC1 et KANB selon des conditions standard de PCR. Une bande ~400 pb était présente pour les clones positifs.

Remplacement des gènes par natMX4

Pour étudier l'intégrité des fourches de réplication chez la levure humanisée, plusieurs gènes ont été invalidés par le marqueur de résistance à la nourseothricin : natMX4. Par exemple, pour construire la souche *mrc1::natMX4*, le remplacement complet de l'ORF (de l'ATG au STOP) a été effectué en utilisant les amorces MRC1-NAT-FOR et MRC1-NAT-REV dans une réaction PCR comprenant, 10 ng de pAG25, 200 µM de chaque dNTP, 500 nM de chaque amorce, 1X de tampon Taq, 5% DMSO, 0.05% Tween 20, 5U Taq DNA polymerase (New England Biolabs). Les conditions de réaction étaient les suivantes : 4 min de dénaturation initiale à 94°C, suivi de 35 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 55°C, 3 min à 65°C, pour finir avec 20 min à 65°C. Une bande ~1.4 Kb était observée sur un gel d'agarose TAE 0.7%. La réaction PCR a été purifiée sur colonne QIAGEN (QIAquick PCR Purification Kit), et transformée dans la souche a3 frag ou g2 frag. Après sélection sur milieu contenant 100 µg/mL clonNAT, l'intégration de la cassette au bon locus a été vérifiée par PCR directement sur les colonies en utilisant les amorces couvrant les jonctions 5' et 3' du locus modifié.

Test de viabilité et buvardage de type Southern (voir chapitre I)

Gel d'agarose à deux dimensions (2D)

Les échantillons d'ADN pour les gels 2D ont été préparés et analysés comme décrit précédemment (Brewer and W. L. Fangman, 1987, Huberman et al., 1987, Wu and Gilbert, 1995, Dandjinou et al., 2006). Les souches a3 frag, a3 frag *rrm3Δ*, g2 frag et g2 frag *rrm3Δ*, ont été cultivées en milieu YPD à 30°C jusqu'à saturation, diluées à OD₆₆₀ de 0.2 et de nouveau poussées jusqu'en phase exponentielle, OD₆₆₀ autour de 0.680 soit ~ 1 X 10⁷ cellules/mL. Pour préserver les intermédiaires de réplication, 0.1% d'azide de sodium (NaN₃) a été ajouté aux cellules avant que celles-ci soient récoltées. Les noyaux ont été isolés en brisant la paroi des cellules avec des billes de verre (Acid-washed glass beads de Sigma), dans un tampon NIB (17% glycérol, 50 mM tampon MOPS, 150 mM acétate de potassium, 2 mM chlorure de magnésium, 500 μM spermidine et 150 μM spermine), puis l'ADN génomique total a été obtenu en utilisant une version modifiée du protocole *Qiagen Genomic DNA Handbook* avec des colonnes *QIAGEN Genomic-tip 20/G*. 8 μg d'ADNg ont été digérés avec l'enzyme ClaI pour libérer les intermédiaires de réplication télomériques Y' dont les fragments sont de 5.3 Kb et 6.2 Kb, et séparés dans une 1^{ère} puis 2nd dimension.

RÉSULTATS

Phénotypes associés à la perturbation de la télomérase chez la levure humanisée.

Afin de mieux comprendre le rôle de la télomérase dans le contexte de la levure humanisée, nous avons affecté les composantes centrales de la télomérase, *tlc1h* ou *EST2*, ou empêché la télomérase d'accéder à son substrat télomérique.

L'abolition de l'expression de la composante ARN de la télomérase (*tlc1h*) est létale chez la levure humanisée

Il est possible de moduler le niveau d'expression d'un gène quand celui-ci est sous le contrôle d'un promoteur tétracycline (Gari *et al.*, 1997; Belli *et al.*, 1998a 1998b). Nous avons pris avantage de cette méthode pour réprimer l'expression de *tlc1h* dans la levure humanisée. Avec ce système, l'expression de *tlc1h* a lieu en l'absence de la molécule effectrice (tétracycline ou autres molécules de la même famille), alors que son addition inhibe le transactivateur tTA (domaine activateur de VP16 viral fusionné au répresseur inductible à la tétracycline (*tetR*) encodé par l'opéron de résistance à la tétracycline) et ainsi éteint l'expression de *tlc1h*. Le mode opératoire suivi pour la substitution de promoteur est illustré à la figure 23A. La souche humanisée g2 a subi cette transformation pour donner notre souche de travail g2tetO₂-*tlc1h*. Sur un milieu synthétique complet (YC), la présence du nouveau promoteur tetO₂ semble affecter légèrement la cellule : la population des colonies est hétérogène et celles-ci ont des bords irréguliers avec une consistance friable. Néanmoins la longueur des télomères de ces cellules est identique par rapport à la souche parentale, et ces cellules peuvent être propagées pendant de nombreuses générations sans problème apparent de sénescence (données non montrées). Les mêmes cellules ont été striées sur milieu YC complet additionné de 10 µg/mL de doxycycline, et le résultat est sans équivoque : aucune croissance n'est visible sur ce milieu (figure 23B).

En conclusion, l'abolition de l'expression de *tlc1h* mène à une perte immédiate de la viabilité des cellules humanisée sans étape de sénescence.

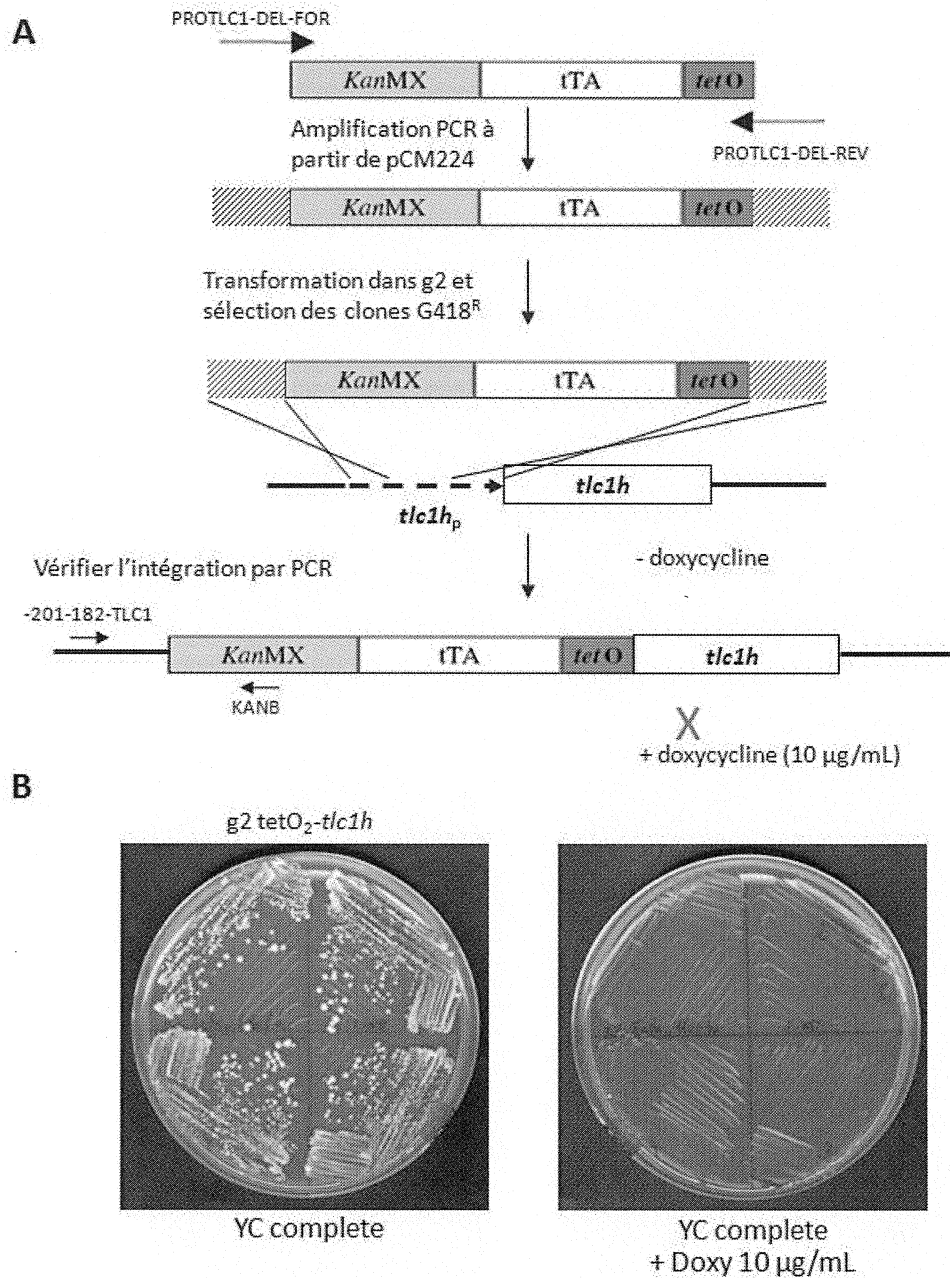


Figure 23 : l'abolition de l'expression de *tlc1h* est létale chez la levure humanisée

(A) Mode opératoire du remplacement du promoteur original de *tlc1h* par un promoteur tétracycline régulable selon Belli et al., 1998. (B) En présence de doxycycline, la souche g2tetO₂-*tlc1h* n'est plus capable de croître. La lecture des boîtes s'est effectuée après 3 jours d'incubation à 30°C

L'abolition de l'activité catalytique de la télomérase est létale chez la levure humanisée

La matrice ARN de la télomérase semble être capitale pour la survie des levures humanisées. En ce qui concerne l'autre composante centrale de la télomérase, l'unité catalytique *EST2*, nous avons étudié son rôle chez la levure humanisée en exprimant un mutant catalytique de ce gène décliné sous les formes *est2D670A* et *CDC13-est2D670A*. En parallèle, les contrôles respectifs *EST2* et *CDC13-EST2* ont été exprimés.

Pour apprécier l'effet de ces différents gènes dans les cellules humanisées, nous avons utilisé comme souche de travail la levure humanisée BY4705 *est2::HIS3 tlc1::KanMX4* dont les gènes invalidés ont été complétés par les plasmides pRS316-*EST2* ou pRS316-*CDC13-EST2*, et pTLC1hTRP. Cette souche a été transformée avec les plasmides encodant pour les différentes versions de *EST2* présentes sur le vecteur pRS415. En résumé, chaque souche contient un plasmide exprimant une version WT de *EST2* à partir d'un plasmide ayant pour marqueur *URA3* (pRS316-*EST2* ou pRS316-*CDC13-EST2*), et un plasmide exprimant une autre version de *EST2* à partir d'un plasmide *LEU2* (pRS415-*EST2*, pRS415-*est2D670A* etc.). Cette configuration expérimentale a été établie à l'identique dans une levure sauvage.

Le test de viabilité sur boîte a été effectué pour mesurer l'effet du mutant catalytique de la télomérase. Les différentes souches représentant les différentes combinaisons génétiques ont été cultivées dans YC-HIS-TRP-LEU-URA Glc jusqu'en phase exponentielle, puis des dilutions en série ont été appliquées en parallèle sur milieux YC-HIS-TRP-LEU-URA Glc (contrôle de croissance) et FOA-HIS-TRP-LEU (essai). Ce dernier milieu contient du 5-FOA, qui en présence d'un gène *URA3* actif, va être converti en un composant toxique pour la cellule. Ainsi sur ce

milieu, le plasmide pRS316-EST2 ou pRS316-CDC13-EST2 sera perdu, et seul l'effet du plasmide LEU2 sera apprécié.

Dans un contexte humanisé avec pRS316-EST2, le passage sur milieu FOA est immédiatement létal avec le vecteur vide : *EST2* est essentiel dans les cellules humanisées. Un phénotype similaire est observé avec *est2D670A* et *CDC13-est2D670A* : une forme catalytique active de la télomérase et ciblée aux télomères est essentielle pour maintenir la viabilité des levures humanisées. L'analyse des télomères de ces cellules exprimant les 2 plasmides (pRS316-EST2 et pRS415 -X) montrent que quelle que soit la version de *EST2* exprimée dans les cellules humanisées, il n'y a pas de modification au niveau de la taille des télomères : le système de régulation de la longueur des télomères est différent dans le contexte humanisé (discuté plus loin). Les télomères de levures humanisées étant plus courts à la base (~ 150 pb), il se peut que le seuil de sénescence soit rapidement atteint dans ces cellules dépourvues d'une télomérase fonctionnelle. Nous avons donc refait cette même expérience mais dans des cellules où l'on a rallongé les télomères en exprimant pRS316-CDC13-EST2. Dans ce contexte, tout le bloc télomérique devrait remonter comme observé dans les souches WT plus pRS316-CDC13-EST2 (figure 25), mais la particularité des séquences humanisées instaure une marque différente dans le système de régulation de la longueur des télomères (discuté plus loin). Néanmoins, malgré que les télomères restent courts ceux-ci sont plus hétérogènes en longueur, dès lors nous avons entrepris de réaliser l'expérience. Identique aux résultats présentés à la figure 24A, même en rallongeant partiellement les télomères au départ, un phénotype de létalité est observé chez les cellules dépourvues de *EST2* ou exprimant une version *est2D670A* (figure

24B) : une catalyse fréquente de l'élongation des télomères par le domaine transcriptase inverse de *EST2* est capitale pour assurer la survie des levures humanisées.

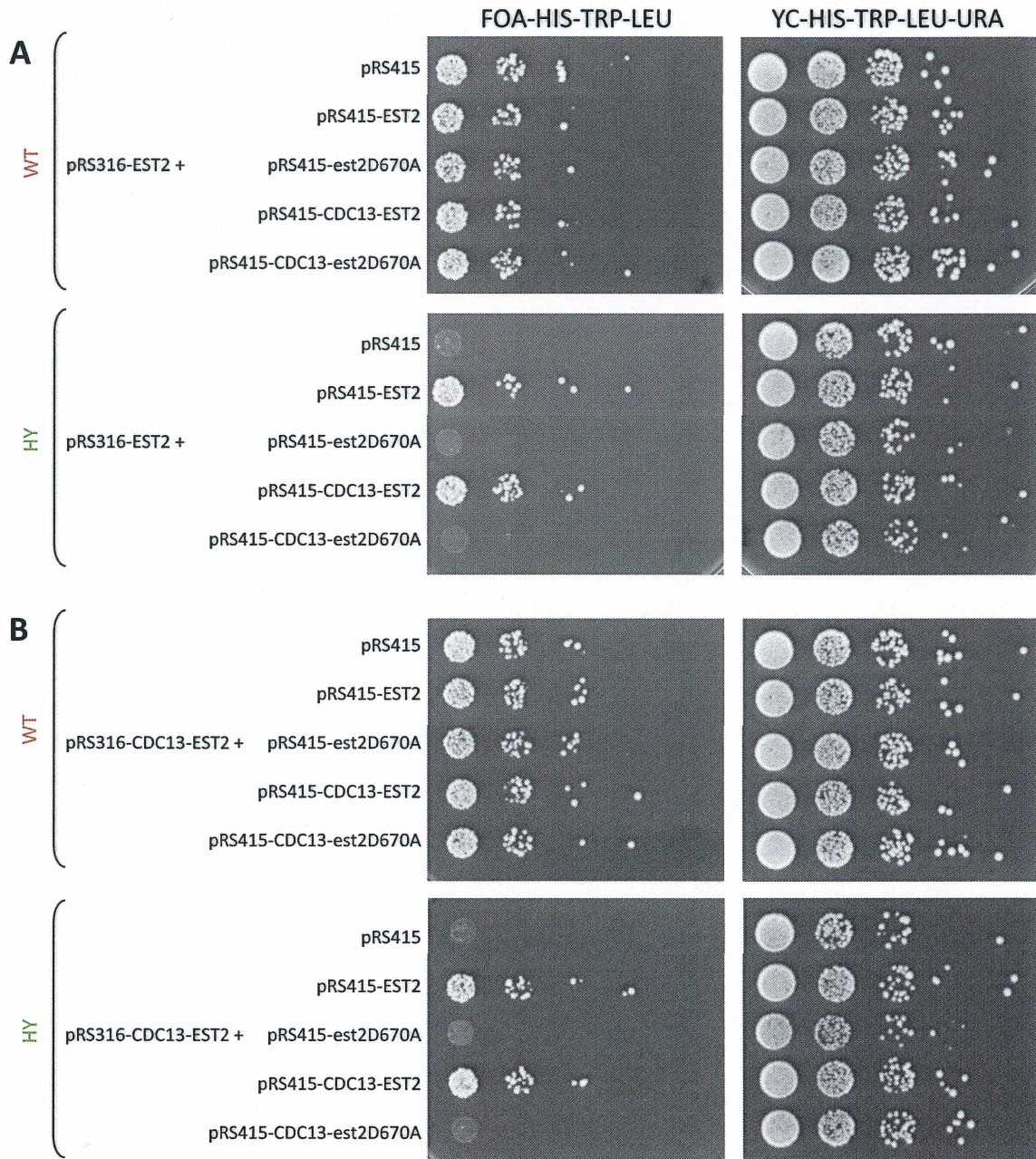


Figure 24: l'expression du mutant catalytique est2D670A est létale chez la levure humanisée.

Des cellules sauvages (WT: haploïde BY4705 *est2::HIS3 tlc1::KanMX4* avec pRS316-EST2 (A) ou pRS316-CDC13-EST2 (B) et *pTLC1TRP*), ou humanisées (HY: haploïde BY4705 *est2::HIS3 tlc1::KanMX4* avec pRS316-EST2 (A) ou pRS316-CDC13-EST2 (B) et *pTLC1hTRP*), ont été transformées avec plusieurs plasmides LEU2 (pRS415) comprenant différentes versions de *EST2*. Ces cellules ont été poussées en milieu YC-H-T-L-U Glc jusqu'en phase exponentielle et chaque culture a été diluée en série au 1/10^e puis étalée sur milieux FOA-HIS-TRP-LEU Glc et YC-HIS-TRP-LEU-URA Glc. La lecture des boîtes s'est effectuée après 3 jours d'incubation à 30°C.

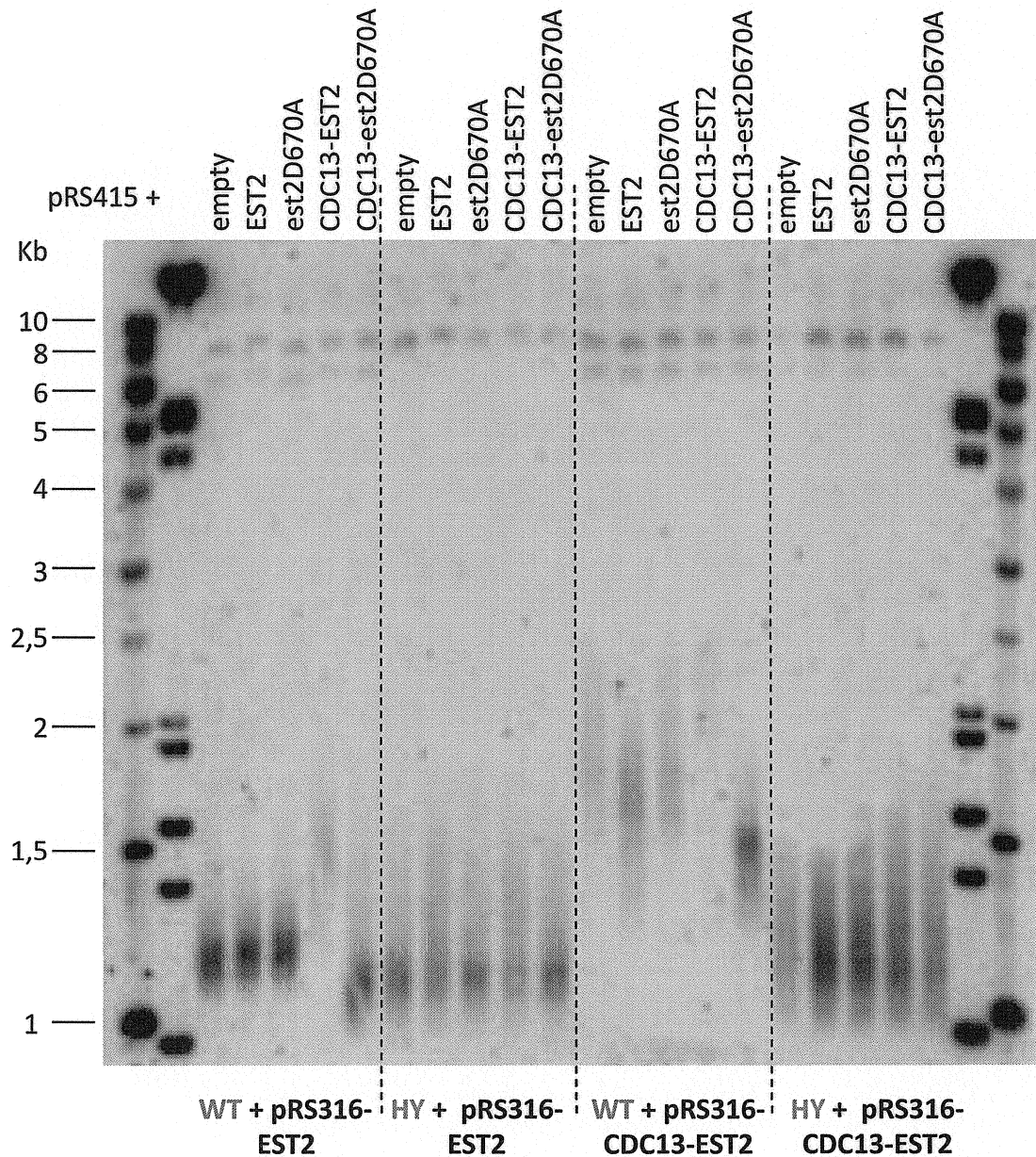


Figure 25 : longueur des télomères chez les levures sauvages (WT) et humanisées (HY) exprimant différentes versions de EST2.

Les 20 souches analysées à la figure ont été cultivées dans YC-H-T-L-U Glc jusqu'en phase stationnaire et leurs ADNg a été extrait et digéré avec XhoI. Les fragments ont été séparés sur gel agarose TBE 0.9%, dénaturés et transférés sur membrane Hybond XL (GE Healthcare) puis analysés par hybridation avec une sonde Y'.

Le déplacement du complexe télomérase de la fin des chromosomes est létal chez la levure humanisée.

Dans le même ordre d'idée que les expériences précédentes, nous avons voulu vérifier l'effet sur la viabilité des levures humanisées quand on déluge la télomérase de son substrat télomérique en surexprimant l'hélicase Pif1p. Les souches contrôles WT et yku80Δ, ainsi que notre souche test humanisée ont été transformées avec un plasmide vide ou le même plasmide contenant *PIF1* ou la forme catalytique inactive *pif1-K264A*. Ces gènes sont sous le contrôle d'un promoteur *GAL1* inductible au galactose. Ces souches ont été cultivées en milieu liquide YC-LEU Glc jusqu'en phase exponentielle puis diluées en série au 1/10^e avant d'être déposées sur milieu YC-LEU Gal ou YC-LEU Glc. La surexpression de Pif1p dans une souche WT ne confère qu'une très légère perte de viabilité (figure 26A). À l'opposé, dans la souche yKu80Δ la surexpression de Pif1p résulte en une réduction très importante de la viabilité, et cette létalité requiert l'activité hélicase de Pif1p car la viabilité est moins affectée quand on surexprime *Pif1p-K264A* (figure 26B). Ces résultats sont conformes à ceux rapportés par le groupe du Dr Zakian (Vega et al., 2007). Dans la souche humanisée, le phénotype est similaire à celui observé dans la souche yku80Δ, à savoir la surexpression de l'hélicase active Pif1p est fatale pour la viabilité des cellules ayant une structure terminale humaine (figure 26C).

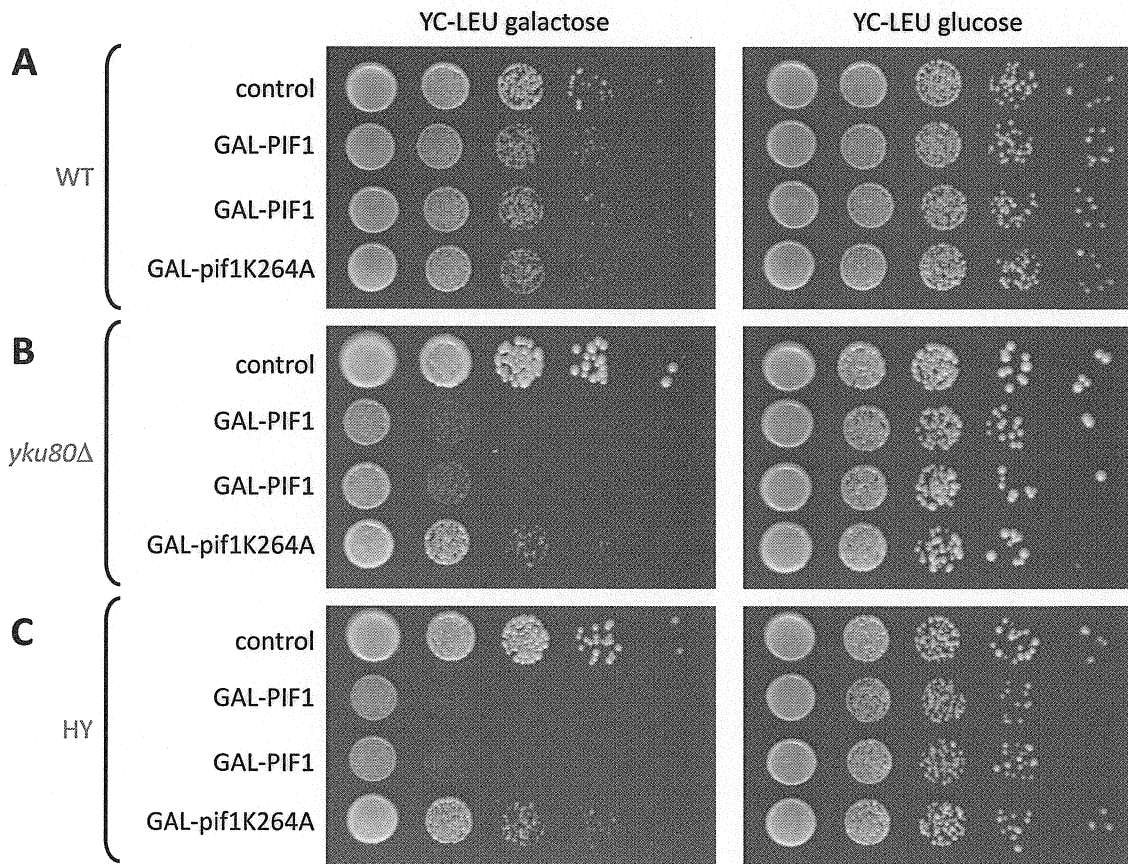


Figure 26: la surexpression de Pif1p est létale chez les cellules *yKu80Δ* et humanisées.

(A) Des cellules sauvages (WT, haploïde BY4705), (B) *yKu80Δ* (haploïde BY4705 *yKu80::KanMX4*) ou (C) humanisées (HY, *g2 frag*), comprenant le vecteur pSH380 seulement (control) ou le vecteur avec Pif1p (GAL-PIF1) ou une forme catalytique inactive de Pif1p (GAL-pif1K264A), ont été poussées jusqu'en phase exponentielle dans YC-LEU Glc 2% à 30°C, et chaque culture a été diluée en série au 1/10^e puis déposée sur milieu YC-LEU Gal 2% ou YC-LEU Glc 2%. La lecture des boîtes s'est effectuée après 3 jours (YC-LEU Gal) ou 2 jours (YC-LEU Glc) d'incubation à 30°C.

D'après les résultats ci-dessus, l'humanisation des télomères a pour effet de rendre indispensable la télomérase dans les cellules humanisées, ce qui attribue à la télomérase un nouveau statut qui normalement est non essentielle dans les cellules sauvages (pendant au moins 60 Gén. mais ensuite celles-ci viendront à mourir). On pourrait penser que dans le contexte humanisé la télomérase agirait assez fréquemment, pratiquement à chaque cycle cellulaire, pour compenser une perte importante et courante de séquences télomériques. Nous

nous sommes dès lors demandé si un problème de réplication des répétitions télomériques humaines par la machinerie de réplication de l'ADN de la levure était la cause de cet ajustement de la télomérase. Nous avons donc vérifié cette hypothèse en analysant par gel d'électrophorèse 2 dimensions les intermédiaires de réplication au niveau des télomères humanisés.

Réplication des télomères chez la levure humanisée.

Pauses aux fourches de réplication des télomères humanisés

Pour mettre en évidence les problèmes de réplication (si problèmes il y a) au niveau des télomères humanisés, nous avons comparé les patrons de réplication des télomères de souches WT et humanisées. Comme contrôle positif nous avons désactivé l'hélicase Rrm3p dans ces souches pour provoquer des pauses de réplication au niveau des régions sous-télomériques et télomériques. Après culture de ces souches dans des conditions appropriées, l'ADN génomique a été extrait puis digéré avec l'enzyme ClaI. Les fragments ont été séparés sur gels, dans un premier temps selon la taille dans une 1^{ère} dimension (figure 27A), puis en fonction de la taille et de la forme dans une 2nd dimension (figure 27B). La révélation des intermédiaires de réplication aux télomères Y' s'est faite par hybridation avec une sonde Y'. L'interprétation du patron des intermédiaires de réplication Y' est compliqué du fait qu'il existe 2 types de séquence Y' [Y' long à 6.7 kb et Y' court à 5.2 kb] (Louis et Haber, 1990a), et que la taille de chacun varie en fonction du nombre de répétitions en tandem d'une séquence de 36 pb qu'il contient (Horowitz et Haber, 1984). Toutefois ceux-ci ont déjà été étudiés dans Ivessa et al.,

2002 (figure 28A). De nombreux sites de pauses de réplication sont présents au niveau de l'ADN Y' en plus des pauses intrinsèques au télomère, mais dans notre cas nous nous intéresserons seulement aux sites de pauses au niveau des répétitions télomériques levures ou humaines du télomère Y' long terminal (illustré par le chiffre 1 à la figure 28A). La digestion avec l'enzyme ClaI libère un fragment de 5.3 Kb qui correspond à l'élément Y' long terminal (figure 28A, astérisque), et un fragment de 6.2 Kb qui correspond à l'élément Y' long interne (figure 28A, losange). La flèche représentée sur les gels correspond à la position du spot 2N des télomères Y' long terminaux, soit la toute extrémité du télomère qui comprend les séquences télomériques (figure 28B). Pour mieux comparer l'intensité de la pause due aux répétitions télomériques [C_1A_3/TG_{1-3}] ou [C_3TA_2/T_2AG_3], un agrandissement des résultats en B est représenté à la figure 28C et les résultats de la quantification du spot 2N sont représentés à la figure 28D. Le niveau de pause au télomère Y' long terminal est 2.2 fois supérieur dans la souche humanisée que dans la souche WT ; et les rapports WT *rrm3Δ*/WT et HY *rrm3Δ*/HY sont de 1.5 et 1.2 respectivement : les répétitions télomériques humaines augmentent les pauses de réplication au niveau des télomères de la levure humanisée, et le fait d'inactiver Rrm3p dans la souche humanisée ne vient que très légèrement aggraver ce phénotype, ce qui vient appuyer d'avantage l'idée que les répétitions télomériques humaines à elles seules ralentissent fortement la progression de la fourche de réplication. Finalement, le patron de réplication des télomères Y' dans une souche humanisée révèle des structures que l'on devrait observer seulement dans un contexte *rrm3Δ* à savoir des jonctions Holliday entre éléments Y' long internes (HJ) et des bulles contenant les intermédiaires de réplication des éléments Y' long internes (BU) : la présence de HJ est révélatrice d'un taux élevé de recombinaison entre éléments Y' (discuté plus loin).

Pour confirmer le problème de réplication au niveau des télomères humanisés nous avons exploré la voie génétique.

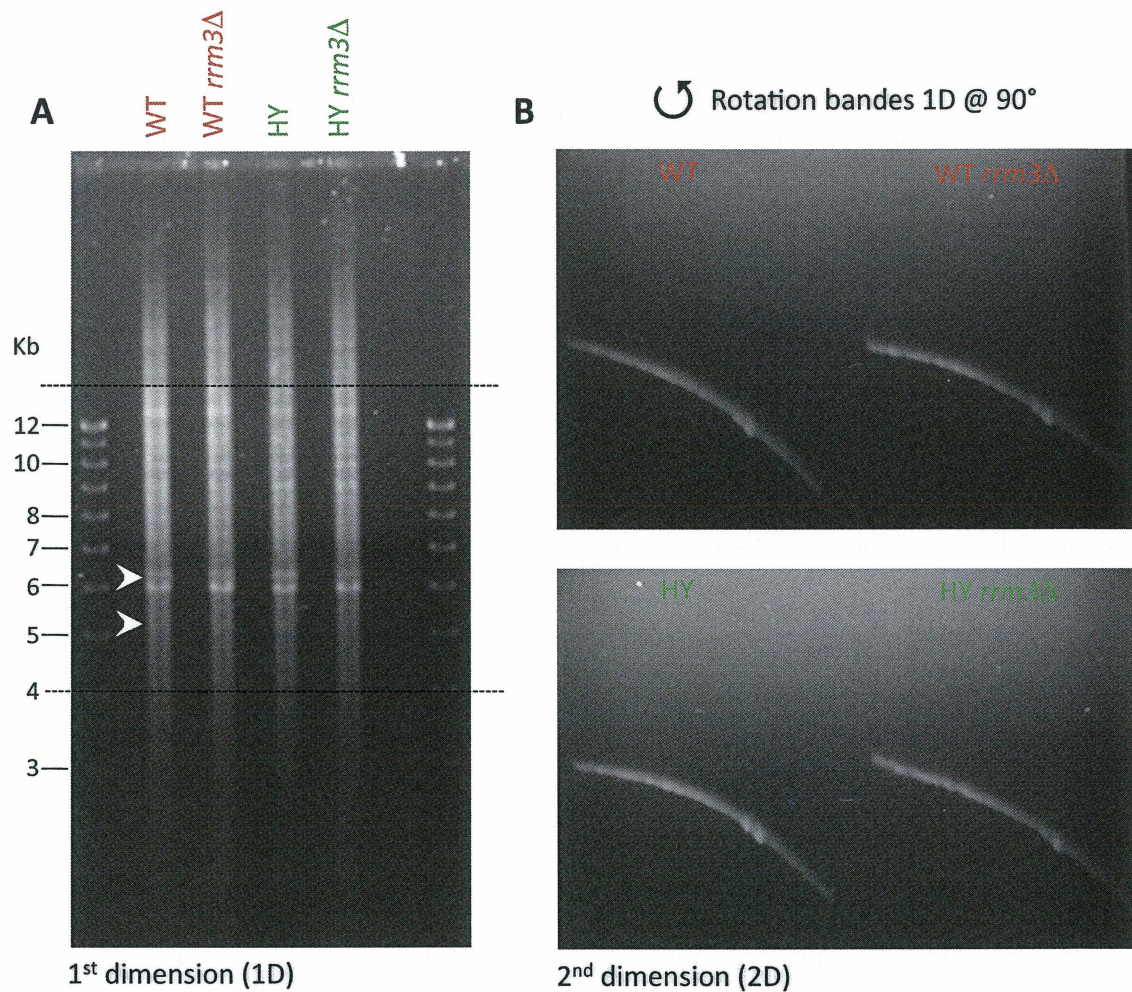


Figure 27 : analyse des intermédiaires de réplifications de télomères par gel 2 dimensions

(A) Gel 1^{ère} dimension. 8 µg d'ADN génomique a été digéré par Clal et les fragments résultants ont été séparés sur gel d'agarose 0.35% (w/v) dans 1X TBE à 0.6 V/cm à température ambiante pendant 60h. À la fin de la migration, une photo a été prise après révélation au bromure d'éthidium (EtBr). **(B)** Gel 2nd dimension. Les pistes ont été excisées du gel 1D, positionnées à 90° sur une nouvelle plateforme de façon à ce que le haut de la bande soit à gauche dans la 2nd dimension. Les bandes ont été scellées dans un gel d'agarose 0.9% dans 1X TBE + 0.3 µg/mL EtBr, et migrées à 2.8 V/cm à 4°C pendant 48h. La photo du gel révèle un arc diagonal généré par les fragments linéaires non répliqués de l'ADN. Les flèches indiquent les positions 5.2 et 6.3 Kb. Les traits en pointillés indiquent les limites de la tranche de gel découpée pour la 2nd dimension.

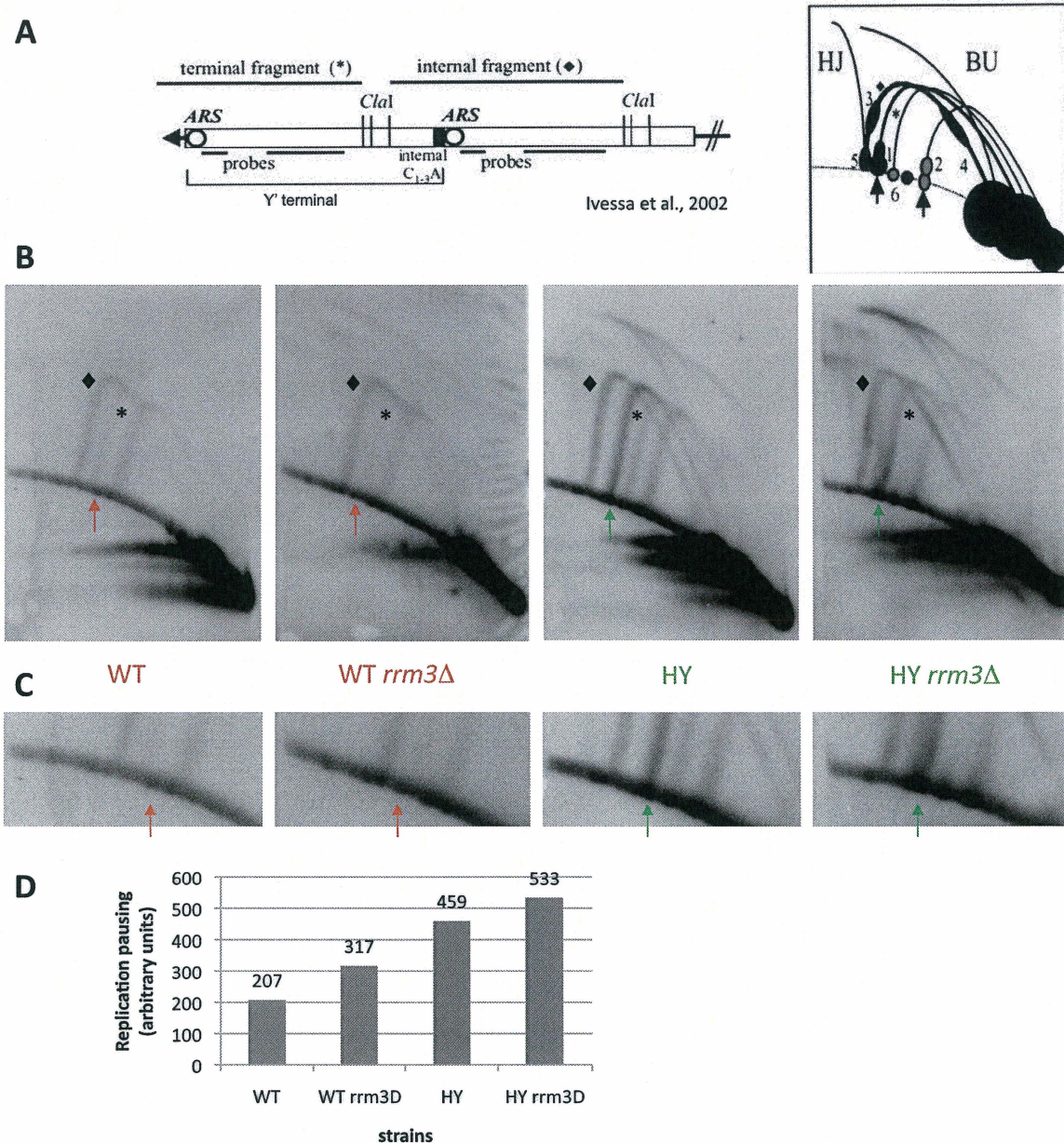


Figure 28: augmentation des pauses de réplication au niveau des télomères humanisés.

(A) Structure des éléments Y' avec le fragment terminal Y' long (*) et le fragment interne Y' long (♦); et illustration des intermédiaires de réplication Y' dans une souche WT *rrm3Δ* (Ivessa et al., 2002). (B) Analyse des intermédiaires de réplication Y' dans les souches WT (a3 frag), WT *rrm3Δ* (a3 frag *rrm3Δ*), HY (g2 frag) et HY *rrm3Δ* (g2 frag *rrm3Δ*). (C) Agrandissement des gels 2D en (B) pour mieux visualiser le signal de pause de réplication au niveau du télomère Y' terminal long (flèche). (D) Quantification du signal de pause avec le logiciel ImageQuant selon Ivessa et al., 2002. HJ: Jonctions Holliday entre éléments Y' long internes; BU: Bulles contenant les intermédiaires de réplication des éléments Y' long internes.

L'absence de certains gènes impliqués dans la réplication de l'ADN ou la recombinaison homologue confirme les défauts de réplication au niveau des télomères humanisés.

Nous avons comparé la viabilité de levures sauvages ou humanisées dans les contextes génétiques *mrc1Δ*, *rrm3Δ* et *rad52Δ*. Ces mutants ont été testés par dépôt de cellules diluées en série sur les milieux YPD, YPD plus HU (hydroxyurea) ou YPD plus MMS (methyl methanesulfonate) (figure 29). Le HU est un inhibiteur de la RNR (Ribonucleotide reductase) qui catalyse l'étape limitante de la production des dNTP, où son activité est précisément contrôlée pour fournir la quantité adéquate de dNTP pour la réplication de l'ADN et la réparation (Nordlund et Reichard, 2006). Le MMS est un agent alkylant l'ADN qui va causer un éventail de structures ADN endommagées dont certaines bloquent les fourches de réplication (Beranek, 1990 ; Lundin et al., 2005). Les cellules déficientes pour la recombinaison homologue sont hypersensibles à cette drogue (Krogh et Symington, 2004). Les résultats de la figure 29 sont compilés dans le tableau 7. En résumé, dans des conditions standards de croissance (YPD), la viabilité est légèrement diminuée dans les cellules humanisées *mrc1Δ* et *rrm3Δ*, et très réduite dans le mutant *rad52Δ*. En présence de HU, les cellules humanisées sont légèrement sensibles mais dans le contexte *mrc1Δ* il y a une perte importante de viabilité. En présence de MMS, les cellules humanisées semblent ne pas être sensibles, mais le deviennent lorsque les gènes *MRC1* et *RRM3* sont manquants. En conclusion, les fourches de réplifications dans les cellules *mrc1Δ*, *rrm3Δ* sont sensibles aux collisions avec les lésions ADN induites par le MMS et sensibles aux pauses de réplication induites par la déplétion des nucléotides due au HU ; les événements de recombinaisons entre télomères sembleraient aussi jouer un rôle important dans le maintien des télomères chez la levure humanisée (discuté plus loin).

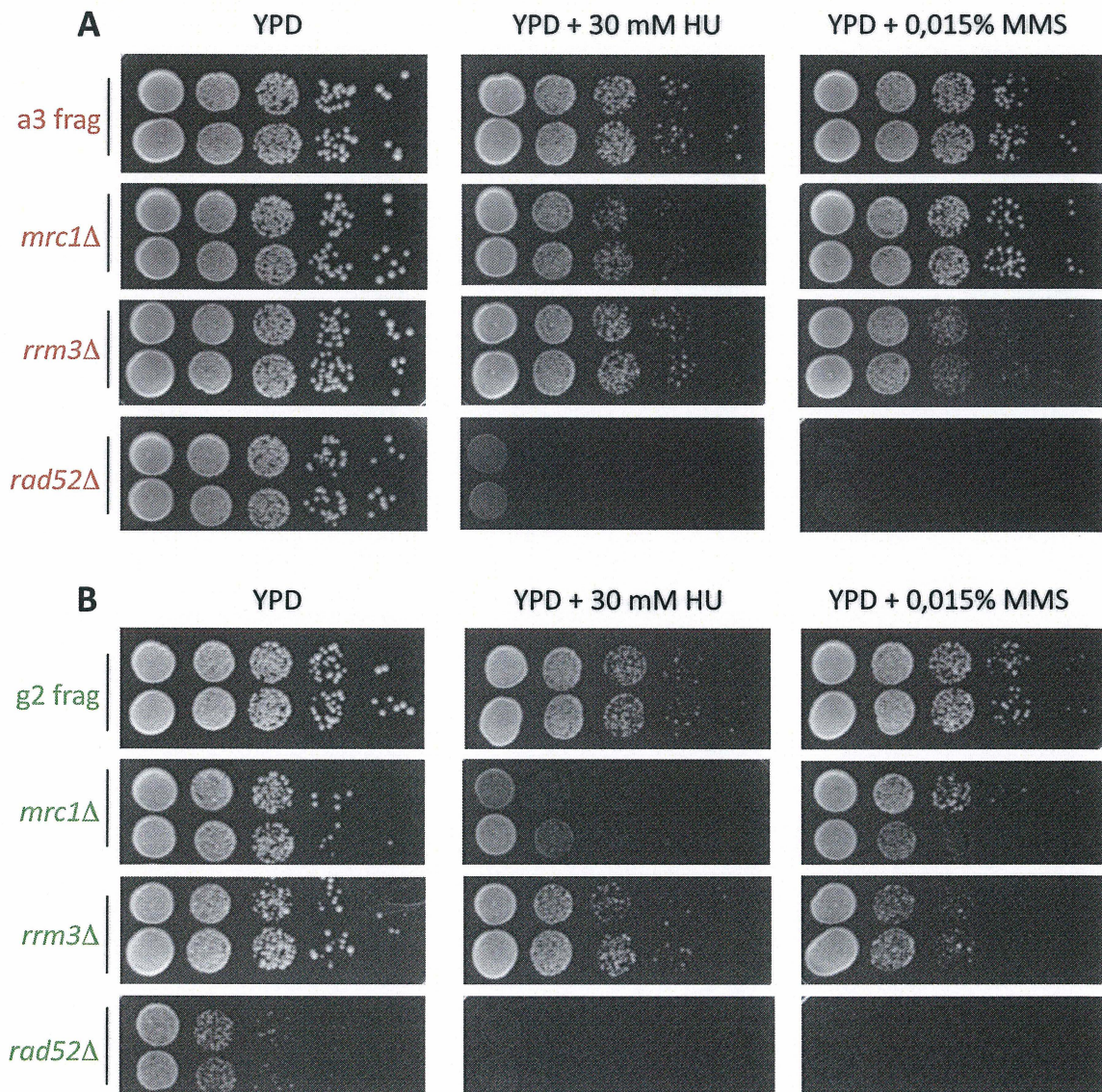


Figure 29 : viabilité des levures sauvages et humanisées dans différents contextes génétiques et différentes conditions de croissance.

(A) Des cellules sauvages (a3 frag) ou (B) humanisées (g2 frag), où certains gènes ont été invalidés par le marqueur natMX4, ont été poussées jusqu'en phase exponentielle dans le milieu YPD, et chaque culture a été diluée en série au 1/10^e puis déposée sur milieu YPD, YPD 30 mM HU ou YPD 0.015% MMS. La lecture des boîtes s'est effectuée après 2 jours d'incubation à 30°C.

	YPD	HU	MMS
<i>g2 frag</i>	=	↓	=
<i>mrc1Δ</i>	↓	↓↓↓	↓↓
<i>rrm3Δ</i>	↓	↓	↓
<i>rad52Δ</i>	↓↓↓	=	=

Tableau 7 : Viabilité des levures humanisées dans différents contextes génétiques et différentes conditions de croissance

Résumé des résultats de la figure où la viabilité de différentes levures humanisées a été comparée dans les situations YPD, HU et MMS, par rapport à la viabilité des levures sauvages correspondantes sur YPD, HU et MMS. (=) viabilité identique par rapport à la souche WT correspondante; (↓) viabilité légèrement diminuée; (↓ ↓) viabilité diminuée; (↓ ↓ ↓) viabilité très diminuée.

CHAPITRE IV

Expression d'une télomérase humaine fonctionnelle chez la levure humanisée

Préambule

Mes travaux de recherches de Master avaient pour but d'établir un système de télomères humains chez la levure mais dont le maintien serait assuré uniquement par la télomérase humaine en l'absence de la télomérase de levure. Dans une première tentative dont les résultats sont revus dans Bah et al., 2004, l'expression des deux composantes centrales de la télomérase humaine chez la levure humanisée ne permettait pas d'obtenir une enzyme active *in vivo*, et ce malgré que l'activité télomérase humaine soit reconstituée *ex vivo*. Néanmoins, dans le système utilisé, nous n'étions pas dans de bonnes conditions pour affirmer que la télomérase humaine ne complétait pas car dans le design de cette expérience la plupart des cellules présentaient encore la télomérase de levure. En effet, comme on vient de le voir dans le chapitre précédent, une des particularités des levures synthétisant des répétitions télomériques humaines est la nécessité de maintenir constamment la télomérase de levure pour garantir la survie de ces cellules.

Dans ce chapitre nous verrons les améliorations méthodologiques et génétiques que nous avons apporté à la levure humanisée suite à mes travaux de Master, dans l'espoir d'obtenir une télomérase humaine fonctionnelle *in vivo*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches utilisées

La souche *g2tetO₂-tlc1h* (Mat a ade2 lys2 trp1 ura3 his3 his5 leu2-D1 tetO₂(*tlc1h*)::KanMX4), déjà utilisée au chapitre III et où l'expression de *tlc1h* est modulable par la doxycycline, a été notre cellule hôte dans l'essai de complémentation avec la télomérase humaine.

Plasmides utilisés

Name	Description	insert origin	Reference of plasmid origin
p423-ADH1, p424-ADH1, p425-ADH1, p426-ADH1	the SacI-GAL1-SpeI promoter from p423-GAL1, p424-GAL1, p425-GAL1, p426-GAL1 (Mumberg et al., 1994) was replaced by a SacI-ADH1p-XbaI* promoter or SacI-ADH1p-SpeI promoter	pGAD424	Bartel et al., 1993
* p423-ADH1-hTR	BamHI-hTR-BamHI fragment cloned into p423-ADH1/BamHI	p413-hTR	Bachand et Autexier, 1999
* p426-ADH1- _{hTERT}	EcoRI- _{hTERT} -Sall fragment cloned into p426-ADH1/EcoRI-Sall	pBABE-hPOT1-hTERT	Armbruster et al., 2004
* p426-ADH1- _{hTERT} -hTR	MluI-hTERT-hTR-HindIII fragment cloned into p426-ADH1- _{hTERT} /MluI-HindIII	pEGKT/hTERT-hTRwt	Bachand et al., 2000
p426-ADH1- _{hTERT} -hTRF2- _{hTERT}	SnaBI- _{hTERT} -hTRF2- _{hTERT} -Sall fragment cloned into p426-ADH1/SmaI-Sall	pBABE-hTRF2-hTERT	Armbruster et al., 2003
p426-ADH1- _{hTERT} -hPOT1- _{hTERT}	NheI- _{hTERT} -hPOT1- _{hTERT} -Sall fragment cloned into p426-ADH1/SpeI-Sall	pBABE-hPOT1-hTERT	Armbruster et al., 2004
* p424-ADH1- _{hTERT} -hPOT1	BamHI- _{hTERT} -hPOT1-Sall fragment cloned into p424-ADH1/BamHI-Sall	pBABE-hPOT1	Armbruster et al., 2004
p425-ADH1- _{hTERT} -TPP1	SpeI- _{hTERT} -TPP1-XhoI fragment cloned into p425-ADH1/SpeI-XhoI	pCMV-SPORT6-TINT FL	Susan Smith lab
p424-ADH1- _{hTERT} -DKC1	SpeI- _{hTERT} -DKC1-ClaI PCR fragment cloned into p424-ADH1/SpeI-ClaI	pβmGFP6-DKC1	Pogacic et al., 2000
p423-ADH1- _{hTERT} -DKC1	SpeI- _{hTERT} -DKC1-ClaI PCR fragment cloned into p423-ADH1/SpeI-ClaI	pβmGFP6-DKC1	Pogacic et al., 2000

Tableau 8 : plasmides utilisés

Essai de complémentation

Différentes combinaisons de plasmides - télomérase humaine décliné sous différentes variantes, facteurs associés à la télomérase et facteurs de recrutement aux télomères - ont été transformées dans la souche *g2tetO₂-tlc1h*. Chaque gène est sous le contrôle d'un promoteur ADH1. L'essai de complémentation a été réalisé en réprimant l'expression de la télomérase de levure, dans les cellules exprimant de façon constitutive les

différentes composantes humaines, par ajout de doxycycline dans le milieu de culture. Un résultat positif se traduira par la capacité des cellules à former des colonies sur milieu plus doxycycline. L'expression de toutes les protéines humaines a été vérifiée par Western Blot (données non montrées).

RÉSULTATS

La survie des cellules humanisées *g2tetO₂-tlc1h* est strictement dépendante de la télomérase : en présence de doxycycline (ou absence de *tlc1h*) il y a létalité immédiate des cellules sans sénescence (figure 30A). Nous avons donc avec ces cellules un phénotype simple dont on a pris avantage pour vérifier si les composantes humaines de la télomérase étaient capables de compléter ce phénotype *tlc1hΔ*. Une complémentation fonctionnelle, et donc l'échappement à la mort des cellules dépourvues de télomérase de levure, serait l'effet de l'allongement des télomères par la télomérase humaine qui ajouterait des répétitions [C₃TA₂/T₂AG₃] aux télomères de la levure humanisée.

Différentes combinaisons de plasmides exprimant les composantes humaines ont été transformées dans la souche *g2tetO₂-tlc1h*. L'expression des vecteurs vides ou vecteurs exprimant les composantes humaines ne compromet en rien la survie des cellules cultivées sans doxycycline (figure 30).

L'expression de hTR et hTERT sur 2 plasmides distincts ne permet pas la survie sur YC-HIS-URA + doxycycline (figure 30C). Également, nous avons testé la construction hTERT-hTR décrite par Bachand et al., 2000, qui permet la reconstitution fonctionnelle d'une télomérase

humaine *ex vivo* lorsque hTERT et hTR sont exprimés dans la levure à partir de la même molécule ARN (*cis*). Cette construction facilite l'assemblage de la RNP télomérase humaine et l'expression de hTERT-hTR en *cis* améliore de façon significative l'activité télomérase humaine par rapport à l'expression de hTERT et hTR sur deux plasmides différents. Cependant, la construction hTERT-hTR n'est pas en mesure de compléter l'absence de *tlc1h* (figure 30D).

À cette étape ci on peut conclure que les composantes *hTERT* et *hTR* en elles seules ne sont pas en mesure d'assurer la survie des cellules dépourvues de télomérase de levure. Ce résultat était prévisible du fait que d'autres protéines sont connues pour jouer un rôle dans la régulation de la télomérase chez la levure. Nous avons donc anticipé cette difficulté en fusionnant en N-terminal de hTERT des protéines liant le substrat télomérique. En effet, Il a été démontré chez les cellules humaines que la fusion entre la télomérase humaine (TERT) et certaines protéines télomériques humaines liant les télomères (TRF2, POT1), permettait de cibler directement la télomérase aux télomères, où le résultat était un rallongement très efficace des télomères (Armbruster et al., 2003 et 2004). Malgré cela, même en forçant le recrutement de la télomérase humaine aux télomères humanisés par l'intermédiaire des protéines de fusion il n'y avait pas de complémentation (figure 30E, F et G).

Finalement, la dyskerin (DKC1) a été exprimée de façon concomitante avec hTR et hTERT, ce qui est présumé être la composition minimale requise pour avoir une télomérase humaine catalytiquement active dans les cellules humaines immortalisées (Cohen et al., 2007). Ce nouveau protagoniste ne permet également pas la complémentation (figure 30H), même en combinaison avec hPOT1 et TPP1 (figure 30I et J).

Un manque similaire de complémentation est observé lorsque les différentes combinaisons de composantes humaines sont exprimées dans la souche *g2tetO₂-tlc1h* dépourvue de l'hélicase inhibitrice de la télomérase Pif1p (données non montrées).

De cette étude de complémentation nous pouvons conclure que, en elles-mêmes, les composantes limitantes de la télomérase humaine testées sous différentes formes ne sont pas en mesure de maintenir la survie d'une souche avec des télomères humains dépourvue de la télomérase de levure. Cependant, pour conclure définitivement, des essais d'activité télomérase doivent être réalisés à partir d'extraits protéiques de chaque condition testée pour écarter l'hypothèse que le défaut de complémentation est dû à un manque d'activité télomérase humaine. Cet essai à lui seul validera l'expression des protéines, de la composante ARN hTR et que celles-ci sont capables de s'agencer en une RNP fonctionnelle.

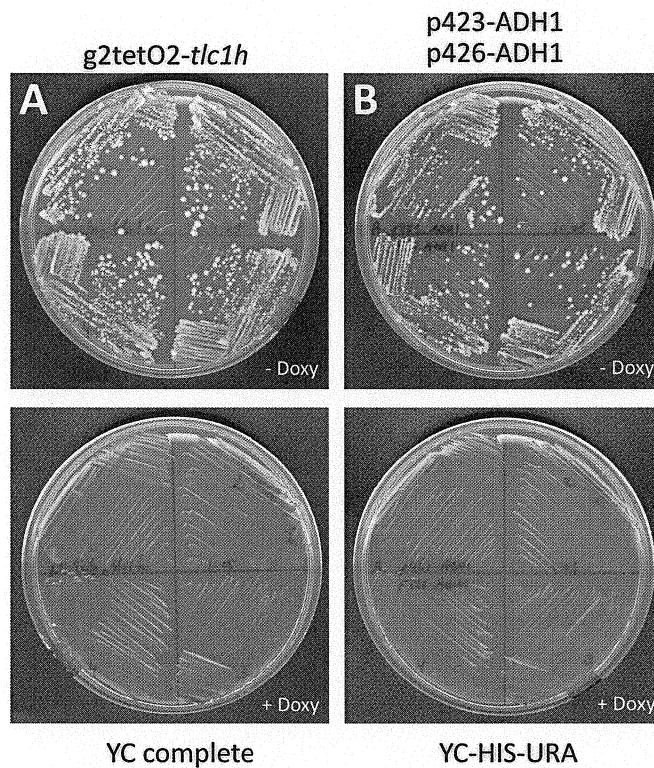


Figure 30: l'expression des composantes humaines de la télomérase ne complémente pas l'absence de télomérase de levure (*tlc1h*Δ) dans une levure humanisée.

La souche g2tetO2-*tlc1h* a été transformée avec des plasmides exprimant différentes versions de la télomérase humaine avec dans certains cas des composantes associées. En l'absence de doxycycline dans le milieu de culture (- Doxy) la télomérase de levure est toujours exprimée alors que sur milieu + Doxy celle-ci est réprimée. Une complémentation fonctionnelle avec la télomérase humaine se traduira par la présence de colonies sur milieu + Doxy.

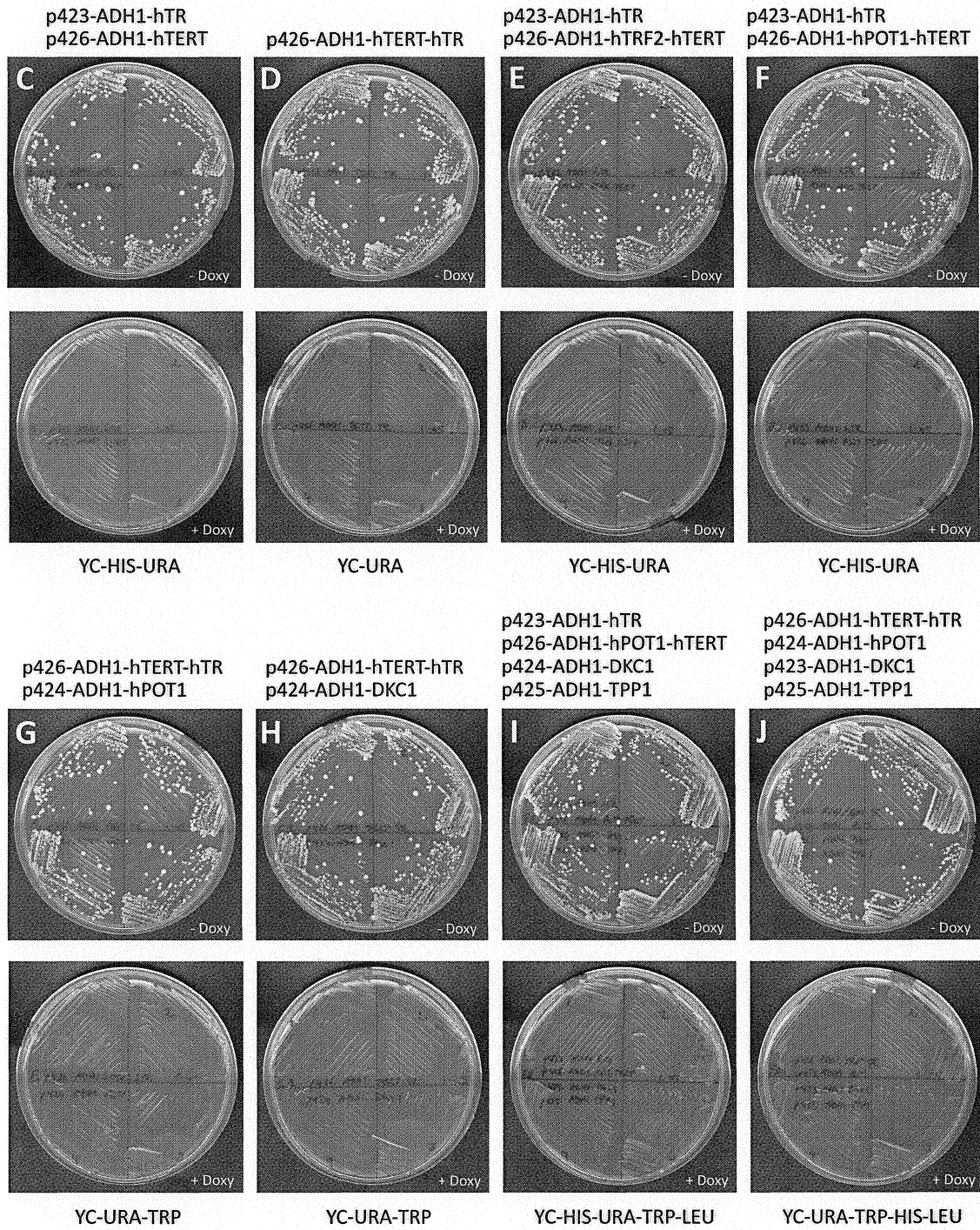


Figure 30: l'expression des composantes humaines de la télomérase ne complète pas l'absence de télomérase de levure (*tlc1hΔ*) dans une levure humanisée. (suite)

DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

La reprogrammation de la séquence ARN matrice de *TLC1* de levure par une matrice humaine (*tlc1h*) résulte en l'incorporation de répétitions télomériques régulières [C_3TA_2/T_2AG_3] aux extrémités des chromosomes de *Saccharomyces cerevisiae* (Henning et al., 1998; Alexander et al., 2003; Brevet et al., 2003 ; Bah et al., 2004) : on parle dès lors de levures humanisées.

Des levures avec des télomères humains : vers une explication de l'évolution des télomères

Les télomères de levures humanisées sont composés de répétitions télomériques levures [$C_{1-3}A/TG_{1-3}$] à l'interne et de répétitions télomériques humaines [C_3TA_2/T_2AG_3] distales avec une extension 3' simple brin T_2AG_3 . Ces télomères mixtes sont stables d'un point de vue mitotique et peuvent se répliquer pendant au moins des centaines de générations (Alexander et al., 2003; Brevet et al., 2003, Bah et al., 2004). Néanmoins, au fur et à mesure que ces cellules vieillissent il y a une conversion progressive des répétitions [$C_{1-3}A/TG_{1-3}$] internes en des répétitions [C_3TA_2/T_2AG_3], pour ne laisser que 50 pb de répétitions originales au final.

Le fait que des séquences humaines soient autorisées aux extrémités des chromosomes de la levure soulève une question cruciale à savoir comment de telles répétitions humaines peuvent être maintenues chez *S. cerevisiae* ?

La réponse à cette question se situerait au niveau de la région sous télomérique des télomères. Par comparaison des répétitions télomériques chez différents organismes, on

remarque que T₂AG₃ est l'unité télomérique la plus répandue (tableau 1) et sa présence aux extrémités chromosomales des levures pourrait indiquer que c'était le télomère ancestral des levures. En effet, les deux éléments sous télomériques X et Y' contiennent une densité importante de répétitions parfaites [C₃TA₂/T₂AG₃] ou apparentées entre leurs jonctions avec les répétitions télomériques [C₁₋₃A/TG₁₋₃] et la séquence ARS (figure 1). Comme chez les séquences télomériques humaines (figure 2), un gradient de conservation de la séquence [C₃TA₂/T₂AG₃] de l'ARS vers les répétitions [C₁₋₃A/TG₁₋₃] est observé. La juxtaposition aux télomères de *S. cerevisiae* de répétitions [C₁₋₃A/TG₁₋₃] authentiques et de répétitions [C₃TA₂/T₂AG₃] suggère que durant l'évolution des levures bourgeonnantes, une nouvelle séquence répétitive télomérique [C₁₋₃A/TG₁₋₃] a été ajoutée à une déjà existante [C₃TA₂/T₂AG₃]. Cette nouvelle séquence télomérique, probablement survenue suite à des changements dans les gènes codant pour la télomérase, a été stabilisée ensuite à travers son interaction avec un ancêtre de Rap1p. Cette hypothèse implique que les anciennes répétitions télomériques ainsi que leurs protéines associées ancestrales sont devenues sous télomérique, ce qui est en accord avec la présence de traces de séquences [C₃TA₂/T₂AG₃] dans les régions sous télomériques adjacentes aux séquences [C₁₋₃A/TG₁₋₃]. Tbf1p, lequel lie toutes les répétitions sous télomériques apparentées à la séquence [C₃TA₂/T₂AG₃], serait dérivé de protéines télomériques ancestrales. Cette hypothèse est supportée par l'homologie de séquence entre les domaines de liaison à l'ADN de Tbf1p, Taz1p et Rap1p (Brun et al., 1997, Teixeira et Gilson, 2005). Ce modèle de co-évolution entre Rap1p, Tbf1p et l'ADN télomérique indique que les régions sous télomériques de *S. cerevisiae* correspondaient à des anciens télomères et justifieraient donc la maintenance des répétitions humaines distales chez les télomères de *S. cerevisiae*.

Protéines associées aux télomères de levures humanisées, régulation de la longueur des télomères et instabilité génomique

L'évolution des télomères de cellules humanisées en fonction des générations est le résultat de l'humanisation de la télomérase de levure au départ, dont l'effet se répercute sur les protéines associées aux télomères et sur le système de régulation de la taille des télomères.

Les travaux de Alexander et al. 2003 et Brevet et al. 2003 nous ont permis de mieux comprendre l'homéostasie des télomères de levures humanisées. Ces groupes rapportent qu'un télomère unique constitué exclusivement de répétitions télomériques humaines peut être maintenu de façon stable chez la levure humanisée. Par ChIPs ils ont démontré que ce télomère purement humain ne lie ni Rap1p ni Rif1p/Rif2p alors que Cdc13p et Tbf1p sont présents en abondance. Le TPE au niveau de ce télomère est complètement aboli. yKu80p lie également très bien ces séquences humaines et de façon surprenante cette protéine devient essentielle dans le contexte humanisée (données non montrées) (discuté plus loin). Un télomère humanisé constitué de répétitions levures et de répétitions humaines distales lie en quantité moindre Rap1p et Rif1p/Rif2p, alors qu'un enrichissement en Tbf1p et Cdc13p est observé par rapport à un télomère naturel d'une souche sauvage. (Alexander et Zakian, 2003) (figure 31). La protéine Tbf1p se substitue donc à Rap1p et exerce son effet régulateur négatif de la longueur des télomères (Berthiau et al., 2006).

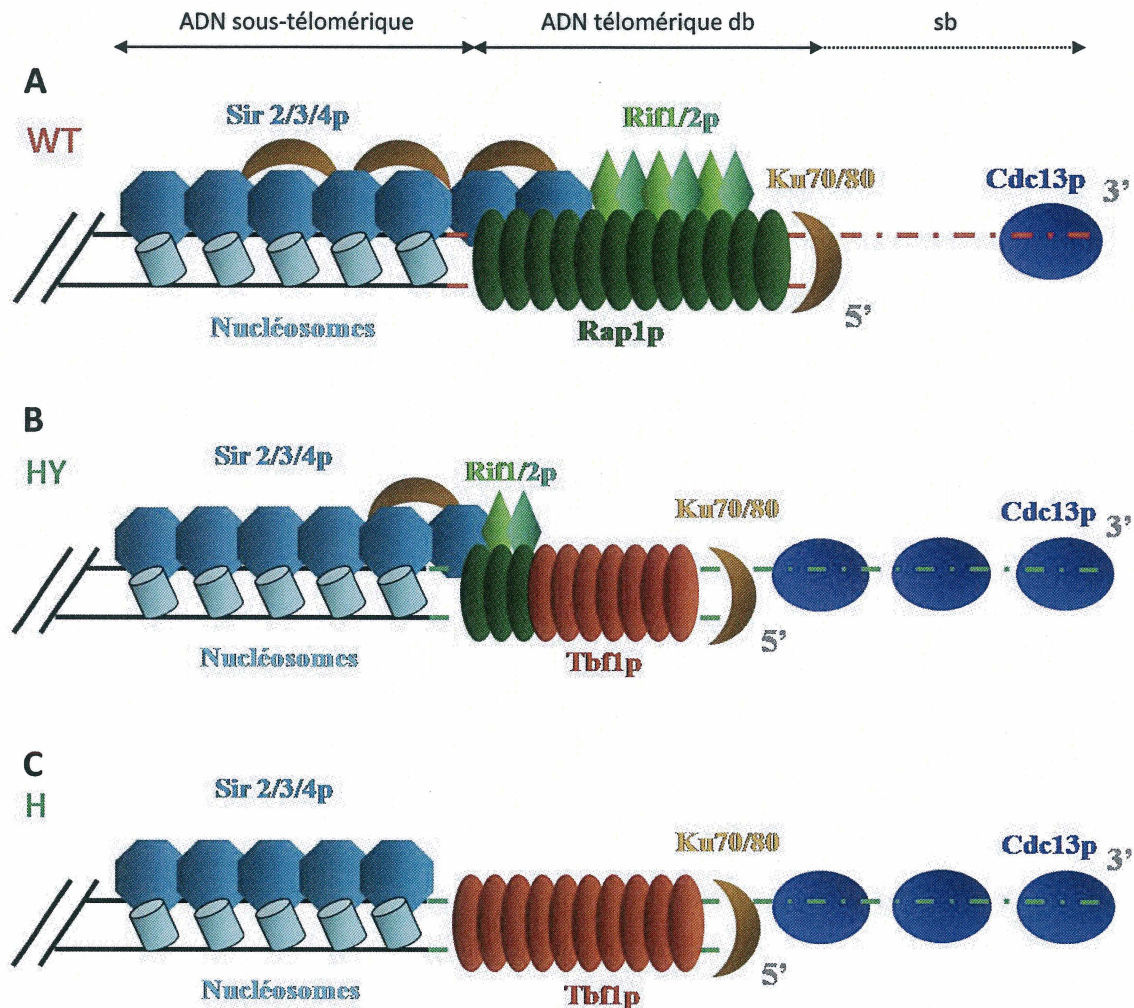


Figure 31 : chromatine télomérique chez différentes souches de levure

Certaines protéines associées aux télomères de différentes souches de levure sont représentées : (A) protéines associées aux télomères d'une souche WT; (B) souche humanisée; (C) souche avec un télomère marqué complètement humain (télomère VII-L avec seulement des répétitions télomériques humaines $[T_2AG_3/C_3TA_2]$ – Alexander et al., 2003; Brevet et al., 2003).

Trois étapes de régulation de la longueur des télomères chez la levure humanisée se succèderaient. Durant une phase initiale, l'ajout des premières répétitions humaines perturbe le nombre de sites de liaison de Rap1p et diminue l'affinité de liaison de Cdc13p : les répétitions $[C_{1-3}A/TG_{1-3}]$ dans les portions plus internes des télomères sont graduellement remplacées par les répétitions $[C_3TA_2/T_2AG_3]$. Tbf1p, qui se lie aux séquences $[C_3TA_2/T_2AG_3]$ nouvellement formées, aurait un effet plus répressif sur le système de régulation de la longueur des

télomères par rapport au complexe Rap1p/Rif1p/Rif2p; et/ou le fait que Cdc13p ait moins d'affinité pour les répétitions télomériques humaines par rapport aux répétitions levures pourrait compromettre l'accès de la télomérase aux télomères humanisés. Ces 2 hypothèses pourraient expliquer le défaut de rallongement des télomères avec la fusion Cdc13-Est2p (figure 25). Du début de l'humanisation des télomères jusqu'à 150 Gén., la quantité des répétitions levures restantes est suffisante pour lier un nombre satisfaisant de molécules Rap1p et on peut présumer à ce stade que le mode de régulation de la longueur des télomères est majoritairement dépendant du complexe autour de Rap1p par rapport aux systèmes de régulation via Tbf1p et Cdc13p.

La transition dans les modes de régulation de la longueur des télomères s'observerait entre 150 et 570 Gén., là où les télomères deviennent tous humanisés, toujours aussi courts mais un peu plus hétérogènes (Bah et al., 2004). Le remplacement de séquence se fait de plus en plus en profondeur et donc de moins en moins de sites de liaison pour Rap1p sont présents aux télomères. La régulation de la longueur des télomères basculerait selon un mode qui n'est plus majoritaire à Rap1p.

Dans une dernière étape, 570 à 2500 Gén., les répétitions mutantes ont remplacé la plupart des répétitions WT loin au sein du télomère pour ne laisser qu'environ 50 bp de répétitions levures (figure 11B) qui peuvent potentiellement lier seulement deux molécules Rap1p. De plus de longues extensions humaines simple brin sont générées (figure 15A). À un tel niveau de remplacement de séquence, la diminution du nombre de sites de liaisons Rap1p devrait induire une élongation massive et non contrôlée des télomères comme dans les allèles *rap1t* dépourvus de la partie C-terminale chez *K. lactis* (Krauskopf et Blackburn; 1998). De plus,

la quasi absence des protéines Rif est normalement associée avec une augmentation de la longueur des télomères (Hardy et al., 1992; Wotton et Shore, 1997). Ce phénotype n'est pas tant prononcé dans nos souches humanisées, tout de même les télomères deviennent un peu plus long et plus hétérogènes et ce seulement après une certaine période de latence durant laquelle les télomères étaient stables et courts (figure 19A).

En résumé, il y a plusieurs mécanismes qui contribuent au taux de remplacement des répétitions télomériques chez la levure humanisée et qui agissent à des fréquences très différentes. Dans un premiers temps, le système de mesure de la longueur des télomères via le comptage des molécules Rap1p liées aux répétitions levures est le mode principal de régulation; et suite à l'humanisation progressive des télomères et donc à la modification de chromatine télomérique, les modes de régulation de la longueur des télomères via Tbf1p, Cdc13p augmenteraient en fréquence d'action et compenseraient le défaut de régulation via Rap1p due au manque de sites de liaisons pour cette molécule.

Les fusions télomère-télomère observées chez les levures humanisées à partir de 1000 Gén. seraient directement reliées au nombre de molécules Rap1p restant au niveau de la portion télomérique levure. En effet, les séquençages de télomères de cellules humanisées à 500, 1000, 1500, 2000 et 2500 générations montrent que 4, 3, 3, 2 et 2 molécules Rap1p respectivement peuvent potentiellement se lier aux répétitions $[C_{1-3}A/TG_{1-3}]$. Les séquençages des fusions T-T des cellules à 2000 et 2500 Gén. indiquent qu'un télomère Y' pouvant lier 6 molécules Rap1p (l'augmentation des répétitions levures de ~ 50 pb à ~ 115 pb s'est sûrement obtenue par recombinaison) est fusionné avec un télomère X où 1 seule molécule Rap1p peut

s'associer. De ces analyses on peut conclure qu'au niveau des télomères humanisés, la liaison de 4 molécules Rap1p (500 Gén.) aux répétitions [C₁₋₃A/TG₁₋₃] serait suffisante pour prévenir les fusions T-T par NHEJ alors qu'aux générations 1000 et plus, le nombre de molécules Rap1 ne seraient pas en quantité suffisante au départ pour contrer d'éventuelles évènements catastrophiques de perte de séquences télomériques.

Les séquences télomériques humaines reconnues comme un dommage par la cellule

La liaison de protéines spécifiques aux séquences télomériques simple brin et double brin permet de contrôler l'accès de la télomérase aux télomères et protège la fin des

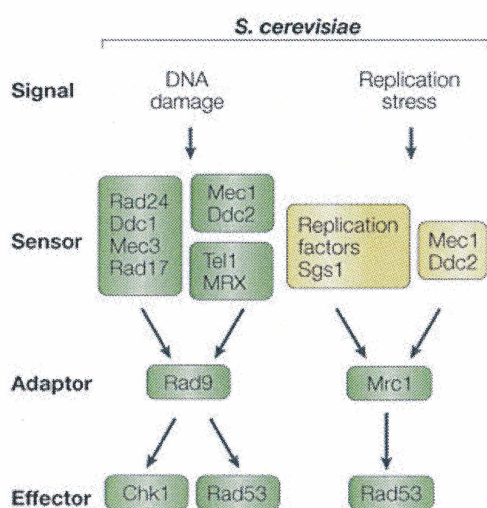


Figure 32 : Propagation du signal de dommage chez la levure *S. cerevisiae*.

Tiré de van Attikum et Gasser, 2005

chromosomes des évènements de recombinaisons et de dégradations qui pourraient mener à l'activation des points de contrôle (figure 32). Lors de dommages à l'ADN ou de problèmes de réplication, ceux-ci sont perçus par les kinases Tel1p et Mec1p, et en fonction de la nature du dommage le signal est propagé à travers les protéines Rad9p ou Mrc1p qui vont répandre le signal aux kinases effectrices Rad53p ou Chk1p (figure 32). Ces dernières vont réguler l'activité de nombreuses cibles dont certaines vont retarder la progression du cycle cellulaire de façon à permettre aux cellules de réparer le dommage ADN ou régler les problèmes liés à la réplication, préservant ainsi la stabilité du génome (Viscardi et al., 2004).

Récemment le laboratoire du Dr Ascenzioni a démontré que leurs levures humanisées activaient de façon chronique Rad53p et que cette activation était *MEC1* (majoritairement), *TEL1* et *RAD9* dépendante (di Domenico et al., 2009). En effet, en l'absence de Mec1p 90% du signal de phosphorylation est perdu alors que dans les cellules humanisées *rad9Δ* il n'y a plus de phosphorylation de Rad53p. Néanmoins, le signal moléculaire responsable de l'activation des points de contrôle n'a pas été investigué dans cette étude.

Dans le chapitre I, nous rapportons que dans notre souche humanisée l'activation de Rad53p n'était pas immédiate suite à l'humanisation des télomères dans les premières générations, mais effective dans les générations avancées. En modifiant la structure terminale des télomères de notre levure humanisée par réintroduction d'une matrice ARN originale, nous avons pu démontrer que les répétitions télomériques humaines distales étaient responsables de l'activation des points de contrôle alors que ces mêmes séquences dans une position interne toujours au niveau des télomères ne causaient ni l'activation de Rad53p, ni le délai en G2/M. En résumé, les télomères humanisés sont perçus comme un dommage par la cellule, c.à.d. qu'au niveau des séquences humaines, une ou plusieurs protéines ne jouent plus le rôle de masque anti-points de contrôle. Les répétitions humaines internes aux télomères, liées par Tbf1p, sont silencieuses car la cellule ne les perçoit pas comme un problème, mais celles-ci sont comptabilisées par le système de régulation de la longueur des télomères (Berthiau et al., 2006). Les soupçons étaient donc dirigés vers le simple brin télomérique humain où l'on pouvait émettre l'hypothèse suivante : la liaison de Cdc13p avec une affinité moindre pour le simple brin télomérique humain n'est pas suffisante pour protéger l'accès des nucléases aux télomères. La dégradation du brin C-riche va générer de longues extensions humaines simples

brin qui seront recouvertes par RPA qui à son tour pourra charger Mec1p qui déclenchera la cascade d'activation de dommage.

En conclusion, le simple brin humain serait responsable de l'activation des points de contrôle chez la levure humanisée.

Le nouveau rôle essentiel de la télomérase chez la levure humanisée révélateur d'un problème de réplication.

Chez la levure les télomères sont maintenus généralement par la télomérase qui inhibe l'autre voie de maintenance qui est la recombinaison homologue (Lundblad et Blackburn, 1993; Teng et Zakian, 1999). La voie privilégiée par les cellules humanisées dans la maintenance de leurs télomères est celle de la télomérase. En effet, nos résultats avec la souche *g2tetO₂-tlc1h* montrent que l'abolition de l'expression de *tlc1h* mène à une mort immédiate des cellules. Un phénotype similaire est observé avec l'expression du mutant catalytique *est2D670A*, la surexpression de Pif1p, et d'autres ont rapporté qu'il n'était pas possible d'obtenir des spores *tlc1h est2* suite à la microdissection d'une souche humanisée diploïde, homozygote *tlc1h/tlc1h* mais hétérozygote *EST2/est2* (Alexander et Zakian, 2003). La maintenance des télomères dans une souche humanisée est donc dépendante de la télomérase qui devient essentielle dans ce contexte (discuté plus loin). Toutefois, des cellules humanisées *rad52Δ* ont un taux de croissance très faible et un sévère défaut de viabilité par rapport à la souche isogénique sauvage (figure 29), et certaines analyses sur gel de télomère avaient montré une amplification des éléments Y' caractéristique des survivants de type I (données non

montrées), ce qui suggère que la voie de la recombinaison aurait son rôle à jouer en duo avec la télomérase dans la maintenance des télomères humanisés.

Nous avons également remarqué que la réplication des télomères humanisés n'était pas aussi efficace que celle des télomères naturels d'une souche sauvage : la pause de la fourche de réplication au niveau des répétitions humaines est 2 fois plus importante. De plus, la délétion de *MRC1*, impliqué dans la stabilisation des fourches de réplication en pauses, compromet fortement la viabilité des levures humanisées lorsque celles-ci sont déjà sensibilisées aux problèmes de réplication avec l'agent chimique HU (figure 29). Il semblerait donc que le réplisome de la levure ait des difficultés à répliquer les télomères humanisés.

Il est connu que les fourches de réplication ralentissent ou voire même s'arrêtent lorsqu'elle rencontrent les séquences répétées des télomères, mais la plupart du temps les fourches de réplication sont capables de résoudre la synthèse de l'ADN télomérique sans s'effondrer ni perdre le réplisome (Ivessa et al., 2002 ; Markovets et al., 2004).

Chez la levure humanisée, les répétitions télomériques humaines aux télomères pourraient refléter une situation pathologique, dont l'origine serait les nouveaux complexes ADN-protéines formés, qui mènerait à l'effondrement des fourches de réplication et la perte du réplisome, avec pour conséquence des cassures ADN db pouvant mener à de l'instabilité génomique.

Le lien avec le nouveau rôle essentiel de la télomérase et le défaut de réplication efficace des télomères humanisés interviendrait à ce niveau où pratiquement à chaque cycle cellulaire la télomérase doit renouveler les séquences humaines par extension du brin G riche

pour permettre à la machinerie conventionnelle de synthétiser le brin C riche complémentaire. Sans ce processus pour combler le manque de réplication de cet ADN (suite à l'effondrement des fourches) de la toute fin du chromosome, il y aurait une létalité immédiate de ces cellules humanisées. (Remarque : les travaux de Haber et Heyer, 2001, montrent aussi que les voies de recombinaison homologue peuvent être utilisées pour rétablir les fourches de réplication qui se seraient effondrées, ce qui expliquerait pourquoi *RAD52* est important pour maintenir la viabilité des levures humanisées).

En accord avec nos résultats, des travaux non publiés montreraient qu'une forte surexpression de l'hélicase Pif1p interférerait avec la réplication de l'ADN causant l'effondrement des fourches de réplication, ce qui se traduira par des télomères tronqués qui devront être rapidement rallongés par la télomérase pour maintenir la viabilité cellulaire (Rothstein lab, 2009 CSH meeting communication).

Finalement, chez la levure de fission *Schizosaccharomyces pombe*, la protéine Taz1 qui lie les séquences ADN télomérique db de *S. pombe*, est indispensable pour la progression efficace des fourches de réplication au niveau des télomères de cet organisme ; la délétion de Taz1 provoque l'arrêt des fourches de réplication et la délétion de la télomérase dans ces cellules *taz1Δ* mène à une perte rapide des séquences télomériques (Miller et al., 2006).

Des résultats non publiés révéleraient que TRF1, qui se lie au niveau des séquences télomériques humaines db chez les mammifères, aurait un rôle similaire à Taz1 au niveau des télomères de mammifères. En effet, les télomères humains seraient des sites fragiles et la délétion de TRF1 induirait les points de contrôle suite aux pauses ou arrêts des fourches de

réplication au sein des télomères. Ces données indiquent donc pour la première fois que les répétitions humaines $[C_3TA_2/T_2AG_3]$ des télomères de mammifères sont une difficulté pour le réplisome, et que TRF1 participe à la réplication adéquate des télomères humains (de Lange lab, 2009 CSH meeting communication).

Chez la levure *S. cerevisiae*, Ku a différents rôles au niveau des télomères à savoir, recruter la télomérase aux télomères, prévenir les évènements de dégradations et de recombinaisons, instaurer le silençage transcriptionnel des gènes avoisinants et localiser les télomères au niveau de l'enveloppe nucléaire (EN) (revu dans Fisher et Zakian, 2005). Pour cette dernière fonction, le ciblage des télomères à l'EN se fait aussi par l'intermédiaire de la protéine Sir4p, et ces deux mécanismes sont redondants. D'un autre côté il est connu que les liaisons de certaines protéines, dont Tbf1p, au niveau de la région sous-télomérique, sont capables de délocaliser les télomères de l'EN et affecteraient négativement l'efficacité de la télomérase (Berthiau et al., 2006, Hediger et al., 2006). Chez la levure humanisée les répétitions $[C_3TA_2/T_2AG_3]$ rendues au bout des télomères sont liées par Tbf1p, et yKu80 devient essentiel dans ces cellules. Pourquoi la levure humanisée n'est pas capable de vivre sans yKu80p ?

L'absence graduelle de molécules Rap1p au niveau des télomères humanisés diminue le nombre de molécules Sir4p et donc le mécanisme de ciblage des télomères à l'EN via cette voie en sera affecté. Seule la voie via yKu80 serait fonctionnelle chez la levure humanisée. Étant donné que la télomérase joue un rôle crucial dans le sauvetage des fourches de réplication brisées de télomères humanisés et que le site de catalyse de répétitions télomériques se

situerait au niveau de l'EN, cette seule voie disponible pour l'ancrage des télomères à l'EN a dès lors une importance vitale pour la cellule.

Finalement, certaines composantes de la machinerie de la télomérase seraient responsables pour le ciblage des DSB au niveau de l'EN, lieu de réparation de ces dommages (Oza et al., 2009 ; Schober et al., 2009). Le recrutement de la télomérase aux télomères par Yku80p via son interaction avec Tlc1, ou le ciblage direct des télomères au niveau de l'EN via yKu80 seraient requis pour permettre à la cellule humanisée de réparer efficacement les DSB qui pourraient avoir lieu suite à l'effondrement des fourches de réplifications.

Expression d'une télomérase humaine fonctionnelle chez la levure

Un dernier volet de cette étude (de l'ordre du défi technologique) a été consacré à l'élaboration d'un système chez *S. cerevisiae* où le maintien des télomères de levures humanisées serait assuré uniquement par la télomérase humaine. La génération d'un tel système hétérologue pourrait se révéler utile dans l'étude de la régulation de cette enzyme. Plusieurs travaux laissaient supposer qu'une complémentation fonctionnelle était possible (Dez et al., 2001 ; Bachand et Autexier, 1999) mais aucun regroupement n'avait été initié avant nos travaux revus dans Bah et al., 2004. Lors de ce premier essai, la télomérase humaine n'était pas capable de maintenir la survie de levures humanisées dépourvues de la télomérase de levure. Dans le cadre de la thèse nous avons tenté différentes orientations, par exemple forcer le recrutement de l'enzyme directement aux télomères ou exprimer le complexe minimal requis chez les cellules humaines pour avoir une activité catalytique, mais malheureusement aucune

de ces stratégies n'a été fructueuse. Nous pouvons donc conclure que la télomérase humaine n'est pas active aux télomères de levures humanisées.

Chez l'humain, la masse moléculaire de l'holoenzyme télomérase est estimée à plus de 1000 kDa (Schnapp et al., 1998 ; Xin et al., 2007), alors que le complexe télomérase catalytique actif a une masse ~ 650 à 670 kDa (Wenz et al., 2001 ; Cohen et al., 2007). Celui-ci correspondrait à la combinaison des masses de 2 molécules hTERT (127 kDa), 2 molécules hTR (153 kDa) et de 2 molécules dyskerine (57 kDa) (Cohen et al., 2007), ce qui suggère fortement que la télomérase agirait sous forme d'un dimère (Cohen et al., 2007 ; Wenz et al., 2001 ; Beattie et al., 2001 ; Arai et al., 2002). Bien que ce complexe minimal de la télomérase humaine permettant l'addition de nucléotides ait été identifié, d'autres protéines s'associent à l'enzyme humaine et jouent des rôles importants à différents niveaux. Récemment il a été démontré que les ATPases pontin et reptin, qui interagissent avec hTERT et la dyskerine, sont essentielles pour l'assemblage du complexe catalytique actif (Venteicher et al., 2009). Une fois le complexe formé, la protéine TCAB1 (telomerase Cajal body protein 1) s'y associe et le dirige aux télomères après une étape dans les «Cajal bodies». La déplétion de TCAB1 empêche l'association de hTR avec les «Cajal bodies», interrompt l'association télomérase-télomère, et abolie la synthèse télomérique par la télomérase (Venteicher et al., 2009).

Finalement, il est possible que la télomérase humaine ne puisse jamais agir aux télomères de levures si l'on considère que la régulation de la télomérase dans ces deux organismes soit trop distante. En effet, les composantes hTR et hTERT ont co-évolué fonctionnellement comme un complexe ribonucléoprotéique pour maintenir la longueur des

télomères. Une telle co-évolution au sein d'une espèce pourrait résulter en l'incompatibilité inter-espèces entre les composantes de l'enzyme. Ce degré d'incompatibilité corrèle avec la distance d'évolution : par exemple, les ARN de la télomérase de lapin et du bovin sont fonctionnellement compatibles avec TERT humain (Xiang et al., 2000 ; Wang et al., 2005), alors que l'ARN de souris de l'est pas (Chen et Greider, 2003). Le remplacement de la région pseudo-nœud de l'ARN humain (hTR) par le domaine pseudo-nœud de l'ARN de *Tetrahymena* (tTR) permet de reconstituer une télomérase humaine active *in vitro* mais ce chimère est incapable de rallonger les télomères *in vivo* (Marie-Egyptienne et al., 2005).

Les éléments qui assurent une telle incompatibilité entre espèces pourraient alors représenter une interaction ARN-ARN ou ARN-protéine spécifique à l'espèce.

REMERCIEMENTS

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont été réalisés dans le cadre du programme de coopération France – Québec, où la cotutelle de thèse de doctorat s’est déroulée en alternance entre l’Ecole Normale Supérieure de Lyon et l’Université de Sherbrooke.

Je tiens à remercier Eric Gilson et Raymund Wellinger d’avoir accepté de prendre part à cette aventure intercontinentale et de joindre l’expertise de chacune de leur équipe pour découvrir les secrets de la levure humanisée. Merci de m’avoir fourni une formation de qualité à travers votre encadrement, les discussions scientifiques, les congrès internationaux et votre confiance accordée tout au long de cette thèse.

Je remercie Stéphane Marcand, Antonin Morillon et Etienne Schwob pour avoir évalué mon manuscrit et leurs remarques pertinentes qui ont aidé à une meilleur compréhension de notre model.

Je suis également redevable envers Silvia Bacchetti (McMaster University, Ontario, Canada), où j’ai été initié à la recherche en étudiant la télomérase. Cette expérience a guidé mes études universitaires et la suite de ma carrière.

Je remercie l’ensemble des personnes passées et présentes de l’ENS Lyon et l’Université de Sherbrooke qui m’ont éclairé sur les phénotypes associés aux levures avec des télomères humains et qui ont fait en sorte que je me sois épanoui aussi bien au niveau professionnel que personnel.

Je remercie l’association pour la recherche sur le cancer (ARC), les instituts en recherche en santé du Canada (IRSC), le ministère Français des affaires étrangères et le ministère Français de l’enseignement supérieur et de la recherche pour le financement et leur aide précieuse pour combler les frais relatifs à la cotutelle de thèse.

Finalement je remercie mes proches et ma famille pour le soutien et la confiance accordée tout au long de ces études universitaires.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Adams Martin, A., Dionne, I., Wellinger, R.J., and Holm, C. (2000) The function of DNA polymerase alpha at telomeric G tails is important for telomere homeostasis. *Mol Cell Biol*, **20**, 786-796.
- Alexander, M.K. and Zakian, V.A. (2003) Rap1p telomere association is not required for mitotic stability of a C(3)TA(2) telomere in yeast. *Embo J*, **22**, 1688-1696.
- Ancelin, K., Brunori, M., Bauwens, S., Koering, C.E., Brun, C., Ricoul, M., Pommier, J.P., Sabatier, L. and Gilson, E. (2002) Targeting assay to study the cis functions of human telomeric proteins: evidence for inhibition of telomerase by TRF1 and for activation of telomere degradation by TRF2. *Mol Cell Biol*, **22**, 3474-3487.
- Armbruster, B.N., Etheridge, K.T., Broccoli, D. and Counter, C.M. (2003) Putative telomere-recruiting domain in the catalytic subunit of human telomerase. *Mol Cell Biol*, **23**, 3237-3246.
- Armbruster, B.N., Linardic, C.M., Veldman, T., Bansal, N.P., Downie, D.L. and Counter, C.M. (2004) Rescue of an hTERT mutant defective in telomere elongation by fusion with hPot1. *Mol Cell Biol*, **24**, 3552-3561.
- Askree, S.H., Yehuda, T., Smolikov, S., Gurevich, R., Hawk, J., Coker, C., Krauskopf, A., Kupiec, M. and McEachern, M.J. (2004) A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants that affect telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8658-8663.
- Azzalin, C.M., Reichenbach, P., Khoraiuli, L., Giulotto, E. and Lingner, J. (2007) Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science*, **318**, 798-801.
- Bachand, F. and Autexier, C. (1999) Functional reconstitution of human telomerase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **274**, 38027-38031.
- Bachand, F. and Autexier, C. (2001) Functional regions of human telomerase reverse transcriptase and human telomerase RNA required for telomerase activity and RNA-protein interactions. *Mol Cell Biol*, **21**, 1888-1897.
- Bah, A., Bachand, F., Clair, E., Autexier, C. and Wellinger, R.J. (2004) Humanized telomeres and an attempt to express a functional human telomerase in yeast. *Nucleic Acids Res*, **32**, 1917-1927.

- Bah, A., Gilson, E. and Wellinger, R.J. (2010) Yeast telomerase becomes essential in humanized yeast cells to guarantee complete replication of humanized telomeres. (*in preparation*).
- Baumann, P. and Cech, T.R. (2001) Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science*, **292**, 1171-1175.
- Baumann, P., Podell, E. and Cech, T.R. (2002) Human Pot1 (protection of telomeres) protein: cytolocalization, gene structure, and alternative splicing. *Mol Cell Biol*, **22**, 8079-8087.
- Baur, J.A., Zou, Y., Shay, J.W. and Wright, W.E. (2001) Telomere position effect in human cells. *Science*, **292**, 2075-2077.
- Beattie, T.L., Zhou, W., Robinson, M.O. and Harrington, L. (1998) Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol*, **8**, 177-180.
- Beattie, T.L., Zhou, W., Robinson, M.O. and Harrington, L. (2000) Polymerization defects within human telomerase are distinct from telomerase RNA and TEP1 binding. *Mol Biol Cell*, **11**, 3329-3340.
- Beattie, T.L., Zhou, W., Robinson, M.O. and Harrington, L. (2001) Functional multimerization of the human telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell Biol*, **21**, 6151-6160.
- Belli, G., Gari, E., Aldea, M., and Herrero, E. (1998a) Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast*, **14**, 1127-1138.
- Belli, G., Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1998b) An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast. *Nucleic Acids Res*, **26**, 942-947.
- Berthiau, A.S., Yankulov, K., Bah, A., Revardel, E., Luciano, P., Wellinger, R.J., Geli, V., and Gilson, E. (2006) Subtelomeric proteins negatively regulate telomere elongation in budding yeast. *EMBO J*, **25**, 846-856.
- Bianchi, A. and Shore, D. (2007a) Early replication of short telomeres in budding yeast. *Cell*, **128**, 1051-1062.
- Bianchi, A. and Shore, D. (2007b) Increased association of telomerase with short telomeres in yeast. *Genes Dev*, **21**, 1726-1730.
- Bianchi, A. and Shore, D. (2008) How telomerase reaches its end: mechanism of telomerase regulation by the telomeric complex. *Mol Cell*, **31**, 153-165.

- Bianchi, A., Smith, S., Chong, L., Elias, P. and de Lange, T. (1997) TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *Embo J*, **16**, 1785-1794.
- Bianchi, A., Stansel, R.M., Fairall, L., Griffith, J.D., Rhodes, D. and de Lange, T. (1999) TRF1 binds a bipartite telomeric site with extreme spatial flexibility. *Embo J*, **18**, 5735-5744.
- Biessmann, H. and Mason, J.M. (1992) Genetics and molecular biology of telomeres. *Adv Genet*, **30**, 185-249.
- Bilaud, T., Brun, C., Ancelin, K., Koering, C.E., Laroche, T. and Gilson, E. (1997) Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet*, **17**, 236-239.
- Bilaud, T., Koering, C.E., Binet-Brasselet, E., Ancelin, K., Pollice, A., Gasser, S.M. and Gilson, E. (1996) The telobox, a Myb-related telomeric DNA binding motif found in proteins from yeast, plants and human. *Nucleic Acids Res*, **24**, 1294-1303.
- Blackburn, E.H. (1992) Telomerases. *Annu Rev Biochem*, **61**, 113-129.
- Blackburn, E.H. and Challoner, P.B. (1984) Identification of a telomeric DNA sequence in *Trypanosoma brucei*. *Cell*, **36**, 447-457.
- Blackburn, E.H. and Gall, J.G. (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol*, **120**, 33-53.
- Blackburn, E.H. and Greider, C.W. (1995) *Telomeres*. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S. and Wright, W.E. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, **279**, 349-352.
- Boulton, S.J. and Jackson, S.P. (1996) Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4639-4648.
- Bourns, B.D., Alexander, M.K., Smith, A.M. and Zakian, V.A. (1998) Sir proteins, Rif proteins, and Cdc13p bind *Saccharomyces* telomeres in vivo. *Mol Cell Biol*, **18**, 5600-5608.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. and Boeke, J.D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, **14**, 115-132.
- Brand, A.H., Micklem, G. and Nasmyth, K. (1987) A yeast silencer contains sequences that can promote autonomous plasmid replication and transcriptional activation. *Cell*, **51**, 709-719.

- Brevet, V., Berthiau, A.S., Civitelli, L., Donini, P., Schramke, V., Geli, V., Ascenzioni, F. and Gilson, E. (2003) The number of vertebrate repeats can be regulated at yeast telomeres by Rap1-independent mechanisms. *Embo J*, **22**, 1697-1706.
- Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (1987). The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell* **51**, 463-471.
- Brigati, C., Kurtz, S., Balderes, D., Vidali, G. and Shore, D. (1993) An essential yeast gene encoding a TTAGGG repeat-binding protein. *Mol Cell Biol*, **13**, 1306-1314.
- Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L. and de Lange, T. (1997) Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet*, **17**, 231-235.
- Brun, C., Marcand, S. and Gilson, E. (1997) Proteins that bind to double-stranded regions of telomeric DNA. *Trends Cell Biol*
- Bryan, T.M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M.A. and Reddel, R.R. (1997) Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med*, **3**, 1271-1274.
- Bryan, T.M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S. and Reddel, R.R. (1995) Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *Embo J*, **14**, 4240-4248.
- Cangiano, G. and La Volpe, A. (1993) Repetitive DNA sequences located in the terminal portion of the *Caenorhabditis elegans* chromosomes. *Nucleic Acids Res*, **21**, 1133-1139.
- Cerezo, A., Kalthoff, H., Schuermann, M., Schafer, B. and Boukamp, P. (2002) Dual regulation of telomerase activity through c-Myc-dependent inhibition and alternative splicing of hTERT. *J Cell Sci*, **115**, 1305-1312.
- Cerone, M.A., Londono-Vallejo, J.A. and Bacchetti, S. (2001) Telomere maintenance by telomerase and by recombination can coexist in human cells. *Hum Mol Genet*, **10**, 1945-1952.
- Chai, W., Ford, L.P., Lenertz, L., Wright, W.E. and Shay, J.W. (2002) Human Ku70/80 associates physically with telomerase through interaction with hTERT. *J Biol Chem*, **277**, 47242-47247.
- Chan, C.S. and Tye, B.K. (1983) Organization of DNA sequences and replication origins at yeast telomeres. *Cell*, **33**, 563-573.
- Chandra, A., Hughes, T.R., Nugent, C.I. and Lundblad, V. (2001) Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev*, **15**, 404-414.

Chapon, C., Cech, T.R. and Zaug, A.J. (1997) Polyadenylation of telomerase RNA in budding yeast. *Rna*, **3**, 1337-1351.

Chen, J.L., Blasco, M.A. and Greider, C.W. (2000) Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell*, **100**, 503-514.

Chen, J.L. and Greider, C.W. (2003) Template boundary definition in mammalian telomerase. *Genes Dev*, **17**, 2747-2752.

Chikashige, Y., Ding, D.Q., Funabiki, H., Haraguchi, T., Mashiko, S., Yanagida, M. and Hiraoka, Y. (1994) Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast. *Science*, **264**, 270-273.

Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P. and de Lange, T. (1995) A human telomeric protein. *Science*, **270**, 1663-1667.

Cohen, S.B., Graham, M.E., Lovrecz, G.O., Bache, N., Robinson, P.J., and Reddel, R.R. (2007) Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science*, **315**, 1850-1853.

Cohn, M. and Blackburn, E.H. (1995) Telomerase in yeast. *Science*, **269**, 396-400.

Colgin, L.M., Baran, K., Baumann, P., Cech, T.R. and Reddel, R.R. (2003) Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase. *Curr Biol*, **13**, 942-946.

Colgin, L.M., Wilkinson, C., Englezou, A., Kilian, A., Robinson, M.O. and Reddel, R.R. (2000) The hTERT α splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity. *Neoplasia*, **2**, 426-432.

Cong, Y.S. and Bacchetti, S. (2000) Histone deacetylation is involved in the transcriptional repression of hTERT in normal human cells. *J Biol Chem*, **275**, 35665-35668.

Cong, Y.S., Wen, J. and Bacchetti, S. (1999) The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet*, **8**, 137-142.

Cong, Y.S., Wright, W.E. and Shay, J.W. (2002) Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev*, **3**, 407-425.

Conrad, M.N., Wright, J.H., Wolf, A.J. and Zakian, V.A. (1990) RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell*, **63**, 739-750.

Cooper, J.P., Nimmo, E.R., Allshire, R.C. and Cech, T.R. (1997) Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast [see comments]. *Nature*, **385**, 744-747.

Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B. and Bacchetti, S. (1992) Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J*, **11**, 1921-1929.

Counter, C.M., Meyerson, M., Eaton, E.N. and Weinberg, R.A. (1997) The catalytic subunit of yeast telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9202-9207.

Dandjinou, A.T., Levesque, N., Larose, S., Lucier, J.F., Abou Elela, S., and Wellinger, R.J. (2004) A phylogenetically based secondary structure for the yeast telomerase RNA. *Curr Biol*, **14**, 1148-1158.

de Bruin, D., Kantrow, S.M., Liberatore, R.A. and Zakian, V.A. (2000) Telomere folding is required for the stable maintenance of telomere position effects in yeast. *Mol Cell Biol*, **20**, 7991-8000.

de Lange, T. (1994) Activation of telomerase in a human tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 2882-2885.

de Lange, T. (2002) Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*, **21**, 532-540.

de Lange, T., Shiue, L., Myers, R.M., Cox, D.R., Naylor, S.L., Killery, A.M. and Varmus, H.E. (1990) Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol*, **10**, 518-527.

Dernburg, A.F., Sedat, J.W. and Hawley, R.S. (1996) Direct evidence of a role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation. *Cell*, **86**, 135-146.

Dez, C., Henras, A., Faucon, B., Lafontaine, D., Caizergues-Ferrer, M. and Henry, Y. (2001) Stable expression in yeast of the mature form of human telomerase RNA depends on its association with the box H/ACA small nucleolar RNP proteins Cbf5p, Nhp2p and Nop10p. *Nucleic Acids Res*, **29**, 598-603.

di Domenico, E.G., Auriche, C., Viscardi, V., Longhese, M.P., Gilson, E., and Ascenzioni, F. (2009) The Mec1p and Tel1p checkpoint kinases allow humanized yeast to tolerate chronic telomere dysfunctions by suppressing telomere fusions. *DNA Repair (Amst)*, **8**, 209-218.

Diede, S.J. and Gottschling, D.E. (1999) Telomerase-mediated telomere addition in vivo requires DNA primase and DNA polymerases alpha and delta. *Cell*, **99**, 723-733.

Dionne, I. and Wellinger, R.J. (1996) Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13902-13907.

Downey, M., Houlsworth, R., Maringele, L., Rollie, A., Brehme, M., Galicia, S., Guillard, S., Partington, M., Zubko, M.K., Krogan, N.J. *et al.* (2006) A genome-wide screen identifies the evolutionarily conserved KEOPS complex as a telomere regulator. *Cell*, **124**, 1155-1168.

- Dragon, F., Pogacic, V. and Filipowicz, W. (2000) In vitro assembly of human H/ACA small nucleolar RNPs reveals unique features of U17 and telomerase RNAs. *Mol Cell Biol*, **20**, 3037-3048.
- DuBois, M.L., Diede, S.J., Stellwagen, A.E. and Gottschling, D.E. (2000) All things must end: telomere dynamics in yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **65**, 281-296.
- Evans, S.K. and Lundblad, V. (1999) Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science*, **286**, 117-120.
- Evans, S.K. and Lundblad, V. (2000) Positive and negative regulation of telomerase access to the telomere. *J Cell Sci*, **113**, 3357-3364.
- Feng, J., Funk, W.D., Wang, S.S., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., Yu, J. and et al. (1995) The RNA component of human telomerase. *Science*, **269**, 1236-1241.
- Ferguson, B.M., Brewer, B.J., Reynolds, A.E. and Fangman, W.L. (1991) A yeast origin of replication is activated late in S phase. *Cell*, **65**, 507-515.
- Ferguson, B.M. and Fangman, W.L. (1992) A position effect on the time of replication origin activation in yeast. *Cell*, **68**, 333-339.
- Fiset, S. and Chabot, B. (2001) hnRNP A1 may interact simultaneously with telomeric DNA and the human telomerase RNA in vitro. *Nucleic Acids Res*, **29**, 2268-2275.
- Fisher, T.S., and Zakian, V.A. (2005) Ku: a multifunctional protein involved in telomere maintenance. *DNA Repair (Amst)*, **4**, 1215-1226.
- Flint, J., Bates, G.P., Clark, K., Dorman, A., Willingham, D., Roe, B.A., Micklem, G., Higgs, D.R. and Louis, E.J. (1997) Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Hum Mol Genet*, **6**, 1305-1313.
- Ford, L.P., Shay, J.W. and Wright, W.E. (2001a) The La antigen associates with the human telomerase ribonucleoprotein and influences telomere length in vivo. *Rna*, **7**, 1068-1075.
- Ford, L.P., Suh, J.M., Wright, W.E. and Shay, J.W. (2000) Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1 and C2 associate with the RNA component of human telomerase. *Mol Cell Biol*, **20**, 9084-9091.
- Ford, L.P., Zou, Y., Pongracz, K., Gryaznov, S.M., Shay, J.W. and Wright, W.E. (2001b) Telomerase can inhibit the recombination-based pathway of telomere maintenance in human cells. *J Biol Chem*, **276**, 32198-32203.

- Forstemann, K., Hoss, M. and Lingner, J. (2000) Telomerase-dependent repeat divergence at the 3' ends of yeast telomeres. *Nucleic Acids Res*, **28**, 2690-2694.
- Fourel, G., Revardel, E., Koering, C.E. and Gilson, E. (1999) Cohabitation of insulators and silencing elements in yeast subtelomeric regions. *Embo J*, **18**, 2522-2537.
- Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1997) A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 837-848.
- Garvik, B., Carson, M. and Hartwell, L. (1995) Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol Cell Biol*, **15**, 6128-6138.
- Gatbonton, T., Imbesi, M., Nelson, M., Akey, J.M., Ruderfer, D.M., Kruglyak, L., Simon, J.A. and Bedalov, A. (2006) Telomere length as a quantitative trait: genome-wide survey and genetic mapping of telomere length-control genes in yeast. *PLoS Genet*, **2**, e35.
- Gietz, R.D., and Schiestl, R.H. (2007a) High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc*, **2**, 31-34.
- Gietz, R.D., and Schiestl, R.H. (2007b) Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc*, **2**, 38-41.
- Gietz, R.D., and Schiestl, R.H. (2007c) Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc*, **2**, 35-37.
- Gilley, D. and Blackburn, E.H. (1996) Specific RNA residue interactions required for enzymatic functions of Tetrahymena telomerase. *Mol Cell Biol*, **16**, 66-75.
- Gilley, D., Lee, M.S. and Blackburn, E.H. (1995) Altering specific telomerase RNA template residues affects active site function. *Genes Dev*, **9**, 2214-2226.
- Gilson, E. and Geli, V. (2007) How telomeres are replicated. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 825-838.
- Gilson, E., Roberge, M., Giraldo, R., Rhodes, D. and Gasser, S.M. (1993) Distortion of the DNA double helix by RAP1 at silencers and multiple telomeric binding sites. *J Mol Biol*, **231**, 293-310.
- Gottschling, D.E., Aparicio, O.M., Billington, B.L. and Zakian, V.A. (1990) Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell*, **63**, 751-762.
- Grandin, N., Damon, C. and Charbonneau, M. (2000) Cdc13 cooperates with the yeast Ku proteins and stn1 To regulate telomerase recruitment. *Mol Cell Biol*, **20**, 8397-8408.

- Grandin, N., Damon, C. and Charbonneau, M. (2001) Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13. *Embo J*, **20**, 1173-1183.
- Grandin, N., Reed, S.I. and Charbonneau, M. (1997) Stn1, a new *Saccharomyces cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with Cdc13. *Genes Dev*, **11**, 512-527.
- Gravel, S., Larrivee, M., Labrecque, P. and Wellinger, R.J. (1998) Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science*, **280**, 741-744.
- Greider, C.W. (1999) Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell*, **97**, 419-422.
- Greider, C.W. and Blackburn, E.H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*, **43**, 405-413.
- Greider, C.W. and Blackburn, E.H. (1989) A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, **337**, 331-337.
- Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H. and de Lange, T. (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, **97**, 503-514.
- Grobelny, J.V., Kulp-McEliece, M. and Broccoli, D. (2001) Effects of reconstitution of telomerase activity on telomere maintenance by the alternative lengthening of telomeres (ALT) pathway. *Hum Mol Genet*, **10**, 1953-1961.
- Hahn, W.C., Stewart, S.A., Brooks, M.W., York, S.G., Eaton, E., Kurachi, A., Beijersbergen, R.L., Knoll, J.H., Meyerson, M. and Weinberg, R.A. (1999) Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells [see comments]. *Nat Med*, **5**, 1164-1170.
- Hardy, C.F., Sussel, L. and Shore, D. (1992) A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev*, **6**, 801-814.
- Harley, C.B., Futcher, A.B. and Greider, C.W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, **345**, 458-460.
- Harley, C.B., Vaziri, H., Counter, C.M. and Allsopp, R.C. (1992) The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol*, **27**, 375-382.
- Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Bass, M.B., Arruda, I. and Robinson, M.O. (1997a) A mammalian telomerase-associated protein. *Science*, **275**, 973-977.
- Harrington, L., Zhou, W., McPhail, T., Oulton, R., Yeung, D.S., Mar, V., Bass, M.B. and Robinson, M.O. (1997b) Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev*, **11**, 3109-3115.

- Hastie, N.D., Dempster, M., Dunlop, M.G., Thompson, A.M., Green, D.K. and Allshire, R.C. (1990) Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*, **346**, 866-868.
- Hediger, F., Berthiau, A.S., van Houwe, G., Gilson, E., and Gasser, S.M. (2006) Subtelomeric factors antagonize telomere anchoring and Tel1-independent telomere length regulation. *EMBO J*, **25**, 857-867.
- Hemann, M.T. and Greider, C.W. (1999) G-strand overhangs on telomeres in telomerase-deficient mouse cells. *Nucleic Acids Res*, **27**, 3964-3969.
- Henderson, E. (1995) Telomere DNA structure. In Blackburn, E.H. and Greider, C.W. (eds.), *Telomeres*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 11-34.
- Henning, K.A., Moskowitz, N., Ashlock, M.A. and Liu, P.P. (1998) Humanizing the yeast telomerase template. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5667-5671.
- Holt, S.E., Aisner, D.L., Baur, J., Tesmer, V.M., Dy, M., Ouellette, M., Trager, J.B., Morin, G.B., Toft, D.O., Shay, J.W., Wright, W.E. and White, M.A. (1999) Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev*, **13**, 817-826.
- Horowitz, H. and Haber, J.E. (1984) Subtelomeric regions of yeast chromosomes contain a 36 base-pair tandemly repeated sequence. *Nucleic Acids Res*, **12**, 7105-7121.
- Hsu, H.L., Gilley, D., Galande, S.A., Hande, M.P., Allen, B., Kim, S.H., Li, G.C., Campisi, J., Kohwi-Shigematsu, T. and Chen, D.J. (2000) Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes Dev*, **14**, 2807-2812.
- Huard, S., Moriarty, T.J. and Autexier, C. (2003) The C terminus of the human telomerase reverse transcriptase is a determinant of enzyme processivity. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4059-4070.
- Huberman, J.A., Spotila, L.D., Nawotka, K.A., el-Assouli, S.M., and Davis, L.R. (1987) The in vivo replication origin of the yeast 2 microns plasmid. *Cell*, **51**, 473-481.
- Hug, N., and Lingner, J. (2006) Telomere length homeostasis. *Chromosoma*, **115**, 413-425.
- Ivessa, A.S., Zhou, J.Q., Schulz, V.P., Monson, E.K., and Zakian, V.A. (2002) Saccharomyces Rrm3p, a 5' to 3' DNA helicase that promotes replication fork progression through telomeric and subtelomeric DNA. *Genes Dev*, **16**, 1383-1396.
- Jones, J.M., Gellert, M. and Yang, W. (2001) A Ku bridge over broken DNA. *Structure (Camb)*, **9**, 881-884.

- Kelleher, C., Teixeira, M.T., Forstemann, K. and Lingner, J. (2002) Telomerase: biochemical considerations for enzyme and substrate. *Trends Biochem Sci*, **27**, 572-579.
- Kilian, A., Bowtell, D.D., Abud, H.E., Hime, G.R., Venter, D.J., Keese, P.K., Duncan, E.L., Reddel, R.R. and Jefferson, R.A. (1997) Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet*, **6**, 2011-2019.
- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L. and Shay, J.W. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, **266**, 2011-2015.
- Kipling, D. and Cooke, H.J. (1990) Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature*, **347**, 400-402.
- Kirk, K.E., Harmon, B.P., Reichardt, I.K., Sedat, J.W. and Blackburn, E.H. (1997) Block in anaphase chromosome separation caused by a telomerase template mutation [see comments]. *Science*, **275**, 1478-1481.
- Klobutcher, L.A., Swanton, M.T., Donini, P. and Prescott, D.M. (1981) All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 3015-3019.
- Konig, P., Giraldo, R., Chapman, L. and Rhodes, D. (1996) The crystal structure of the DNA-binding domain of yeast RAP1 in complex with telomeric DNA. *Cell*, **85**, 125-136.
- Krauskopf, A. and Blackburn, E.H. (1998) Rap1 protein regulates telomere turnover in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12486-12491.
- Krogh, B.O., and Symington, L.S. (2004) Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet*, **38**, 233-271.
- Kyrion, G., Boakye, K.A. and Lustig, A.J. (1992) C-terminal truncation of RAP1 results in the deregulation of telomere size, stability, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **12**, 5159-5173.
- Laroche, T., Martin, S.G., Gotta, M., Gorham, H.C., Pryde, F.E., Louis, E.J. and Gasser, S.M. (1998) Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Curr Biol*, **8**, 653-656.
- Larose, S., Laterreur, N., Ghazal, G., Gagnon, J., Wellinger, R.J., and Elela, S.A. (2007) RNase III-dependent regulation of yeast telomerase. *J Biol Chem*, **282**, 4373-4381.

- Le, S., Moore, J.K., Haber, J.E. and Greider, C.W. (1999) RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics*, **152**, 143-152.
- Le, S., Sternglanz, R. and Greider, C.W. (2000) Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Mol Biol Cell*, **11**, 999-1010.
- LeBel, C., Larrivee, M., Bah, A., Laterreur, N., Lvesque, N., and Wellinger, R.J. (2006) Assessing telomeric phenotypes. *Methods Mol Biol*, **313**, 265-316.
- Lee, J., Mandell, E.K., Tucey, T.M., Morris, D.K., and Lundblad, V. (2008) The Est3 protein associates with yeast telomerase through an OB-fold domain. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 990-997.
- Lejnine, S., Makarov, V.L. and Langmore, J.P. (1995) Conserved nucleoprotein structure at the ends of vertebrate and invertebrate chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2393-2397.
- Lendvay, T.S., Morris, D.K., Sah, J., Balasubramanian, B. and Lundblad, V. (1996) Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics*, **144**, 1399-1412.
- Leonardi, J., Box, J.A., Bunch, J.T., and Baumann, P. (2008) TER1, the RNA subunit of fission yeast telomerase. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 26-33.
- Li, B., Oestreich, S. and de Lange, T. (2000) Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell*, **101**, 471-483.
- Lin, J., Smith, D.L. and Blackburn, E.H. (2004) Mutant telomere sequences lead to impaired chromosome separation and a unique checkpoint response. *Mol Biol Cell*, **15**, 1623-1634.
- Lin, J.J. and Zakian, V.A. (1996) The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNA-binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13760-13765.
- Lingner, J., Cech, T.R., Hughes, T.R. and Lundblad, V. (1997a) Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11190-11195.
- Lingner, J., Cooper, J.P., and Cech, T.R. (1995) Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science*, **269**, 1533-1534.
- Lingner, J., Hendrick, L.L. and Cech, T.R. (1994) Telomerase RNAs of different ciliates have a common secondary structure and a permuted template. *Genes Dev*, **8**, 1984-1998.
- Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V. and Cech, T.R. (1997b) Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*, **276**, 561-567.

- Liu, Z.P. and Tye, B.K. (1991) A yeast protein that binds to vertebrate telomeres and conserved yeast telomeric junctions. *Genes Dev*, **5**, 49-59.
- Loayza, D. and De Lange, T. (2003) POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature*, **424**, 1013-1018.
- Longhese, M.P., Plevani, P. and Lucchini, G. (1994) Replication factor A is required in vivo for DNA replication, repair, and recombination. *Mol Cell Biol*, **14**, 7884-7890.
- Louis, E.J. (1995) The chromosome ends of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **11**, 1553-1573.
- Louis, E.J. and Haber, J.E. (1990a) Mitotic recombination among subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **124**, 547-559.
- Louis, E.J. and Haber, J.E. (1990b) The subtelomeric Y' repeat family in *Saccharomyces cerevisiae*: an experimental system for repeated sequence evolution. *Genetics*, **124**, 533-545.
- Louis, E.J. and Haber, J.E. (1992) The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **131**, 559-574.
- Lundblad, V. and Blackburn, E.H. (1993) An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell*, **73**, 347-360.
- Lundblad, V. and Szostak, J.W. (1989) A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell*, **57**, 633-643.
- Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A.S., and Helleday, T. (2005) Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res*, **33**, 3799-3811.
- Lustig, A.J. (2001) Cdc13 subcomplexes regulate multiple telomere functions. *Nat Struct Biol*, **8**, 297-299.
- Makarov, V.L., Hirose, Y. and Langmore, J.P. (1997) Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell*, **88**, 657-666.
- Makovets, S., Herskowitz, I. and Blackburn, E.H. (2004) Anatomy and dynamics of DNA replication fork movement in yeast telomeric regions. *Mol Cell Biol*, **24**, 4019-4031.
- Marcand, S., Brevet, V. and Gilson, E. (1999) Progressive cis-inhibition of telomerase upon telomere elongation. *Embo J*, **18**, 3509-3519.

Marcand, S., Gilson, E. and Shore, D. (1997) A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science*, **275**, 986-990.

Maringele, L., and Lydall, D. (2006) Pulsed-field gel electrophoresis of budding yeast chromosomes. *Methods Mol Biol*, **313**, 65-73.

Masutomi, K., Kaneko, S., Hayashi, N., Yamashita, T., Shirota, Y., Kobayashi, K. and Murakami, S. (2000) Telomerase activity reconstituted in vitro with purified human telomerase reverse transcriptase and human telomerase RNA component. *J Biol Chem*, **275**, 22568-22573.

McCarroll, R.M. and Fangman, W.L. (1988) Time of replication of yeast centromeres and telomeres. *Cell*, **54**, 505-513.

McClintock, B. (1939) The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **25**, 405-416.

McClintock, B. (1941) The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics*, **26**, 234-282.

McEachern, M.J. and Blackburn, E.H. (1995) Runaway telomere elongation caused by telomerase RNA gene mutations. *Nature*, **376**, 403-409.

McEachern, M.J. and Blackburn, E.H. (1996) Cap-prevented recombination between terminal telomeric repeat arrays (telomere CPR) maintains telomeres in *Kluyveromyces lactis* lacking telomerase. *Genes Dev*, **10**, 1822-1834.

McEachern, M.J., Iyer, S., Fulton, T.B. and Blackburn, E.H. (2000a) Telomere fusions caused by mutating the terminal region of telomeric DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11409-11414.

McElligott, R. and Wellinger, R.J. (1997) The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *Embo J*, **16**, 3705-3714.

Meyerson, M., Counter, C.M., Eaton, E.N., Ellisen, L.W., Steiner, P., Caddle, S.D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R.L., Davidoff, M.J., Liu, Q., Bacchetti, S., Haber, D.A. and Weinberg, R.A. (1997) hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*, **90**, 785-795.

Miller, K.M., Rog, O., and Cooper, J.P. (2006) Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1. *Nature*, **440**, 824-828.

Misiti, S., Nanni, S., Fontemaggi, G., Cong, Y.S., Wen, J., Hirte, H.W., Piaggio, G., Sacchi, A., Pontecorvi, A., Bacchetti, S. and Farsetti, A. (2000) Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Mol Cell Biol*, **20**, 3764-3771.

Mitchell, J.R. and Collins, K. (2000) Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell*, **6**, 361-371.

Mitchell, J.R., Wood, E. and Collins, K. (1999) A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*, **402**, 551-555.

Moriarty, T.J., Huard, S., Dupuis, S. and Autexier, C. (2002) Functional multimerization of human telomerase requires an RNA interaction domain in the N terminus of the catalytic subunit. *Mol Cell Biol*, **22**, 1253-1265.

Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L. and Wu, J.R. (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 6622-6626.

Muller, H.J. (1938) The remaking of chromosomes. *The Collecting Net*, **13**, 181-195, 198.

Munoz-Jordan, J.L., Cross, G.A., Lange, T. and Griffith, J.D. (2001) t-loops at trypanosome telomeres. *Embo J*, **20**, 579-588.

Murti, K.G. and Prescott, D.M. (1999) Telomeres of polytene chromosomes in a ciliated protozoan terminate in duplex DNA loops. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14436-14439.

Nakamura, T.M., Cooper, J.P. and Cech, T.R. (1998) Two modes of survival of fission yeast without telomerase. *Science*, **282**, 493-496.

Nakamura, T.M., Morin, G.B., Chapman, K.B., Weinrich, S.L., Andrews, W.H., Lingner, J., Harley, C.B. and Cech, T.R. (1997) Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*, **277**, 955-959.

Nordlund, P., and Reichard, P. (2006) Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem*, **75**, 681-706.

Nugent, C.I., Hughes, T.R., Lue, N.F. and Lundblad, V. (1996) Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science*, **274**, 249-252.

Nugent, C.I. and Lundblad, V. (1998) The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev*, **12**, 1073-1085.

Olovnikov, A.M. (1971) [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. *Dokl Akad Nauk SSSR*, **201**, 1496-1499.

- Osterhage, J.L., Talley, J.M., and Friedman, K.L. (2006) Proteasome-dependent degradation of Est1p regulates the cell cycle-restricted assembly of telomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 720-728.
- Oza, P., Jaspersen, S.L., Miele, A., Dekker, J., and Peterson, C.L. (2009) Mechanisms that regulate localization of a DNA double-strand break to the nuclear periphery. *Genes Dev*, **23**, 912-927.
- Palm, W., and de Lange, T. (2008) How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet*, **42**, 301-334.
- Pardo, B., Ma, E., and Marcand, S. (2006) Mismatch tolerance by DNA polymerase Pol4 in the course of nonhomologous end joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **172**, 2689-2694.
- Pardo, B., and Marcand, S. (2005) Rap1 prevents telomere fusions by nonhomologous end joining. *EMBO J*, **24**, 3117-3127.
- Pennock, E., Buckley, K. and Lundblad, V. (2001) Cdc13 Delivers Separate Complexes to the Telomere for End Protection and Replication. *Cell*, **104**, 387-396.
- Perrem, K., Colgin, L.M., Neumann, A.A., Yeager, T.R. and Reddel, R.R. (2001) Coexistence of alternative lengthening of telomeres and telomerase in hTERT-transfected GM847 cells. *Mol Cell Biol*, **21**, 3862-3875.
- Pogacic, V., Dragon, F. and Filipowicz, W. (2000) Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10. *Mol Cell Biol*, **20**, 9028-9040.
- Polotnianska, R.M., Li, J. and Lustig, A.J. (1998) The yeast Ku heterodimer is essential for protection of the telomere against nucleolytic and recombinational activities. *Curr Biol*, **8**, 831-834.
- Ponzi, M., Pace, T., Dore, E. and Frontali, C. (1985) Identification of a telomeric DNA sequence in *Plasmodium berghei*. *Embo J*, **4**, 2991-2995.
- Porter, S.E., Greenwell, P.W., Ritchie, K.B. and Petes, T.D. (1996) The DNA-binding protein Hdf1p (a putative Ku homologue) is required for maintaining normal telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **24**, 582-585.
- Prescott, J. and Blackburn, E.H. (1997a) Functionally interacting telomerase RNAs in the yeast telomerase complex. *Genes Dev*, **11**, 2790-2800.

- Prescott, J. and Blackburn, E.H. (1997b) Telomerase RNA mutations in *Saccharomyces cerevisiae* alter telomerase action and reveal nonprocessivity in vivo and in vitro. *Genes Dev*, **11**, 528-540.
- Prescott, J.C. and Blackburn, E.H. (2000) Telomerase RNA template mutations reveal sequence-specific requirements for the activation and repression of telomerase action at telomeres. *Mol Cell Biol*, **20**, 2941-2948.
- Qi, H. and Zakian, V.A. (2000) The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and the telomerase-associated est1 protein. *Genes Dev*, **14**, 1777-1788.
- Ray, A. and Runge, K.W. (1999) The yeast telomere length counting machinery is sensitive to sequences at the telomere-nontelomere junction. *Mol Cell Biol*, **19**, 31-45.
- Reichenbach, P., Hoss, M., Azzalin, C.M., Nabholz, M., Bucher, P. and Lingner, J. (2003) A human homolog of yeast Est1 associates with telomerase and uncaps chromosome ends when overexpressed. *Curr Biol*, **13**, 568-574.
- Richards, E.J. and Ausubel, F.M. (1988) Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, **53**, 127-136.
- Ritchie, K.B., Mallory, J.C. and Petes, T.D. (1999) Interactions of TLC1 (which encodes the RNA subunit of telomerase), TEL1, and MEC1 in regulating telomere length in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **19**, 6065-6075.
- Rose, M.D., Winston, F. and Hieter, P. (1990) *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY,
- Schnapp, G., Rodi, H.P., Rettig, W.J., Schnapp, A. and Damm, K. (1998) One-step affinity purification protocol for human telomerase. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3311-3313.
- Schober, H., Ferreira, H., Kalck, V., Gehlen, L.R., and Gasser, S.M. (2009) Yeast telomerase and the SUN domain protein Mps3 anchor telomeres and repress subtelomeric recombination. *Genes Dev*, **23**, 928-938.
- Schoeftner, S. and Blasco, M.A. (2008) Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol*, **10**, 228-236.
- Schramke, V., Luciano, P., Brevet, V., Guillot, S., Corda, Y., Longhese, M.P., Gilson, E. and Geli, V. (2004) RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends. *Nat Genet*, **36**, 46-54.

Schwartz, D.C., and Cantor, C.R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, **37**, 67-75.

Seimiya, H., Sawada, H., Muramatsu, Y., Shimizu, M., Ohko, K., Yamane, K. and Tsuruo, T. (2000) Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *Embo J*, **19**, 2652-2661.

Shampay, J., Szostak, J.W. and Blackburn, E.H. (1984) DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature*, **310**, 154-157.

Shay, J.W. and Bacchetti, S. (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, **33**, 787-791.

Shay, J.W. and Wright, W.E. (1996) Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol*, **8**, 66-71.

Shippen-Lentz, D. and Blackburn, E.H. (1990) Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science*, **247**, 546-552.

Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.

Singer, M.S. and Gottschling, D.E. (1994) TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science*, **266**, 404-409.

Smith, C.D. and Blackburn, E.H. (1999) Uncapping and deregulation of telomeres lead to detrimental cellular consequences in yeast. *J Cell Biol*, **145**, 203-214.

Smith, C.D., Smith, D.L., DeRisi, J.L. and Blackburn, E.H. (2003) Telomeric protein distributions and remodeling through the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **14**, 556-570.

Smith, J., Zou, H. and Rothstein, R. (2000) Characterization of genetic interactions with RFA1: the role of RPA in DNA replication and telomere maintenance. *Biochimie*, **82**, 71-78.

Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M.R., Schnapp, G. and de Lange, T. (2000) Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol*, **20**, 1659-1668.

Snow, B.E., Erdmann, N., Cruickshank, J., Goldman, H., Gill, R.M., Robinson, M.O. and Harrington, L. (2003) Functional conservation of the telomerase protein Est1p in humans. *Curr Biol*, **13**, 698-704.

Starling, J.A., Maule, J., Hastie, N.D. and Allshire, R.C. (1990) Extensive telomere repeat arrays in mouse are hypervariable. *Nucleic Acids Res*, **18**, 6881-6888.

Steiner, B.R., Hidaka, K. and Futcher, B. (1996) Association of the Est1 protein with telomerase activity in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2817-2821.

Stellwagen, A.E., Haimberger, Z.W., Veatch, J.R. and Gottschling, D.E. (2003) Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev*, **17**, 2384-2395.

Stevenson, J.B. and Gottschling, D.E. (1999) Telomeric chromatin modulates replication timing near chromosome ends. *Genes Dev*, **13**, 146-151.

Strahl-Bolsinger, S., Hecht, A., Luo, K. and Grunstein, M. (1997) SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev*, **11**, 83-93.

Sugawara, N. and Szostak, J.W. (1986) Telomeres of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast (Suppl.)*, **1**, 373.

Suka, N., Luo, K. and Grunstein, M. (2002) Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin. *Nat Genet*, **32**, 378-383.

Sussel, L. and Shore, D. (1991) Separation of transcriptional activation and silencing functions of the RAP1-encoded repressor/activator protein 1: isolation of viable mutants affecting both silencing and telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 7749-7753.

Taggart, A.K., Teng, S.C. and Zakian, V.A. (2002) Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science*, **297**, 1023-1026.

Teixeira, M.T., and Gilson, E. (2005) Telomere maintenance, function and evolution: the yeast paradigm. *Chromosome Res*, **13**, 535-548.

Teng, S.C., Chang, J., McCowan, B. and Zakian, V.A. (2000) Telomerase-Independent Lengthening of Yeast Telomeres Occurs by an Abrupt Rad50p-Dependent, Rif-Inhibited Recombinational Process. *Mol Cell*, **6**, 947-952.

Teng, S.C. and Zakian, V.A. (1999) Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **19**, 8083-8093.

Tesmer, V.M., Ford, L.P., Holt, S.E., Frank, B.C., Yi, X., Aisner, D.L., Ouellette, M., Shay, J.W. and Wright, W.E. (1999) Two inactive fragments of the integral RNA cooperate to assemble active telomerase with the human protein catalytic subunit (hTERT) in vitro. *Mol Cell Biol*, **19**, 6207-6216.

Ting, N.S., Yu, Y., Pohorelic, B., Lees-Miller, S.P., and Beattie, T.L. (2005) Human Ku70/80 interacts directly with hTR, the RNA component of human telomerase. *Nucleic Acids Res*, **33**, 2090-2098.

- Tham, W.H. and Zakian, V.A. (2002) Transcriptional silencing at *Saccharomyces* telomeres: implications for other organisms. *Oncogene*, **21**, 512-521.
- Tommerup, H., Dousmanis, A. and de Lange, T. (1994) Unusual chromatin in human telomeres. *Mol Cell Biol*, **14**, 5777-5785.
- Ulaner, G.A., Hu, J.F., Vu, T.H., Oruganti, H., Giudice, L.C. and Hoffman, A.R. (2000) Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium. *Int J Cancer*, **85**, 330-335.
- Ungar, L., Yosef, N., Sela, Y., Sharan, R., Rupp, E. and Kupiec, M. (2009) A genome-wide screen for essential yeast genes that affect telomere length maintenance. *Nucleic Acids Res*, **37**, 3840-3849.
- van Attikum, H. and Gasser, S.M. (2005) The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 757-765.
- van Steensel, B. and de Lange, T. (1997) Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1 [see comments]. *Nature*, **385**, 740-743.
- van Steensel, B., Smogorzewska, A. and de Lange, T. (1998) TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell*, **92**, 401-413.
- Vassetzky, N.S., Gaden, F., Brun, C., Gasser, S.M. and Gilson, E. (1999) Taz1p and Teb1p, two telobox proteins in *Schizosaccharomyces pombe*, recognize different telomere-related DNA sequences. *Nucleic Acids Res*, **27**, 4687-4694.
- Vega, L.R., Mateyak, M.K. and Zakian, V.A. (2003) Getting to the end: telomerase access in yeast and humans. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 948-959.
- Vega, L.R., Phillips, J.A., Thornton, B.R., Benanti, J.A., Onigbanjo, M.T., Toczyski, D.P., and Zakian, V.A. (2007) Sensitivity of yeast strains with long G-tails to levels of telomere-bound telomerase. *PLoS Genet*, **3**, e105.
- Venteicher, A.S., Abreu, E.B., Meng, Z., McCann, K.E., Terns, R.M., Veenstra, T.D., Terns, M.P., and Artandi, S.E. (2009) A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science*, **323**, 644-648.
- Virta-Pearlman, V., Morris, D.K. and Lundblad, V. (1996) Est1 has the properties of a single-stranded telomere end-binding protein. *Genes Dev*, **10**, 3094-3104.

- Viscardi, V., Clerici, M., Cartagena-Lirola, H., and Longhese, M.P. (2005) Telomeres and DNA damage checkpoints. *Biochimie*, **87**, 613-624.
- Wang, F., Podell, E.R., Zaug, A.J., Yang, Y., Baciú, P., Cech, T.R., and Lei, M. (2007) The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature*, **445**, 506-510.
- Wang, J., Xie, L.Y., Allan, S., Beach, D. and Hannon, G.J. (1998) Myc activates telomerase. *Genes Dev*, **12**, 1769-1774.
- Watson, J.D. (1972) Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol*, **239**, 197-201.
- Webb, C.J., and Zakian, V.A. (2008) Identification and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* TER1 telomerase RNA. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 34-42.
- Weinrich, S.L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V.M., Holt, S.E., Bodnar, A.G., Lichtsteiner, S., Kim, N.W., Trager, J.B., Taylor, R.D., Carlos, R., Andrews, W.H., Wright, W.E., Shay, J.W., Harley, C.B. and Morin, G.B. (1997) Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. *Nat Genet*, **17**, 498-502.
- Wellinger, R.J., Ethier, K., Labrecque, P. and Zakian, V.A. (1996) Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell*, **85**, 423-433.
- Wellinger, R.J., Wolf, A.J. and Zakian, V.A. (1993a) Origin activation and formation of single-strand TG1-3 tails occur sequentially in late S phase on a yeast linear plasmid. *Mol Cell Biol*, **13**, 4057-4065.
- Wellinger, R.J., Wolf, A.J. and Zakian, V.A. (1993b) *Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell*, **72**, 51-60.
- Wenz, C., Enenkel, B., Amacker, M., Kelleher, C., Damm, K. and Lingner, J. (2001) Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules. *Embo J*, **20**, 3526-3534.
- Wold, M.S. (1997) Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem*, **66**, 61-92.
- Wotton, D. and Shore, D. (1997) A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **11**, 748-760.
- Wright, J.H., Gottschling, D.E. and Zakian, V.A. (1992) *Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes Dev*, **6**, 197-210.
- Wright, J.H. and Zakian, V.A. (1995) Protein-DNA interactions in soluble telosomes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **23**, 1454-1460.

- Wright, W.E., Brasiskyte, D., Piatyszek, M.A. and Shay, J.W. (1996) Experimental elongation of telomeres extends the lifespan of immortal x normal cell hybrids. *Embo J*, **15**, 1734-1741.
- Wu, J.R., and Gilbert, D.M. (1995) Rapid DNA preparation for 2D gel analysis of replication intermediates. *Nucleic Acids Res*, **23**, 3997-3998.
- Xiang, H., Wang, J., Mao, Y.W. and Li, D.W. (2000) hTERT can function with rabbit telomerase RNA: regulation of gene expression and attenuation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **278**, 503-510.
- Xin, H., Liu, D., Wan, M., Safari, A., Kim, H., Sun, W., O'Connor, M.S., and Songyang, Z. (2007) TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature*, **445**, 559-562.
- Yi, X., White, D.M., Aisner, D.L., Baur, J.A., Wright, W.E. and Shay, J.W. (2000) An alternate splicing variant of the human telomerase catalytic subunit inhibits telomerase activity. *Neoplasia*, **2**, 433-440.
- Yu, G.L. and Blackburn, E.H. (1991) Developmentally programmed healing of chromosomes by telomerase in Tetrahymena. *Cell*, **67**, 823-832.
- Yu, G.L., Bradley, J.D., Attardi, L.D. and Blackburn, E.H. (1990) In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs [see comments]. *Nature*, **344**, 126-132.
- Zakian, V.A. (1989) Structure and function of telomeres. *Annu Rev Genet*, **23**, 579-604.
- Zakian, V.A. (1995) Telomeres: beginning to understand the end. *Science*, **270**, 1601-1607.
- Zakian, V.A. and Blanton, H.M. (1988) Distribution of telomere-associated sequences on natural chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **8**, 2257-2260.
- Zappulla, D.C., and Cech, T.R. (2004) Yeast telomerase RNA: a flexible scaffold for protein subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 10024-10029.
- Zappulla, D.C., Goodrich, K., and Cech, T.R. (2005) A miniature yeast telomerase RNA functions in vivo and reconstitutes activity in vitro. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 1072-1077.
- Zhou, J., Hidaka, K. and Futcher, B. (2000) The Est1 subunit of yeast telomerase binds the Tlc1 telomerase RNA. *Mol Cell Biol*, **20**, 1947-1955.

ANNEXE 1

Bah, A., Bachand, F., Clair, E., Autexier, C. and Wellinger, R.J. (2004) Humanized telomeres and an attempt to express a functional human telomerase in yeast. *Nucleic Acids Res*, **32**, 1917-1927.

Cet article reprend les principaux résultats de cette étude sur les levures humanisées concernant la caractérisation précise des télomères de levure dont la télomérase a été humanisée et l'étude de complémentation avec la télomérase humaine. J'ai réalisé la plupart des expériences publiées dans cet article et ces résultats sont discutés dans ce manuscrit.

Title Page:

Humanized telomeres and an attempt to express a functional human telomerase in yeast.

Amadou Bah¹, François Bachand^{2,3}, Éveline Clair^{1,4}, Chantal Autexier² and Raymund J. Wellinger^{1*}.

1) Dept. of Microbiology and Infectiology, Groupe ARN/RNA Group, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada;

2) Dept. of Anatomy and Cell Biology, Dept. of Medicine, McGill University and Bloomfield Center for Research in Aging, Lady Davis Institute for Medical Research, The Sir Mortimer B. Davis-Jewish General Hospital, Montreal, Canada.

3) Current address: Dept. of Cancer Biology, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA

4) Current address: Dept. of Biochemistry, McGill University, Montreal, Canada

ABSTRACT.

The maintenance of telomeric repeat DNA depends on an evolutionarily conserved reverse transcriptase, called telomerase. *In vitro*, only the catalytic subunit and a telomerase-associated RNA are required for the synthesis of species-specific repeat DNA. In an attempt to establish a heterologous system for the study of the human telomerase enzyme, we expressed the two core components and predicted regulatory subunits in the yeast *S. cerevisiae*. We show that adequate substrates for human telomerase can be generated, the expressed enzyme was localized in the nucleus and it had the capacity to synthesize human specific repeats *in vitro*. However, there was no evidence for human telomerase activity at yeast telomeres *in vivo*. Therefore, functional replacement of the yeast telomerase by the human enzyme may require additional human-specific components. We also replaced the template region of the yeast telomerase RNA with one that dictates the synthesis of vertebrate repeats and performed a detailed molecular analysis of the composition of the telomeres upon outgrowth of such strains. The results suggest that vertebrate repeats on yeast telomeres are subject to a very high degree of repeat turnover and show that an innermost tract of 50 bp of yeast repeats are resistant to replacement.

INTRODUCTION.

The ends of eukaryotic chromosomes, the telomeres, are essential to ensure genome stability and to facilitate the complete replication of chromosomal DNA (for recent reviews, see 1-3). Telomeric DNA in most organisms is composed of short direct repeats and a minimal amount of such repeats is essential to fulfill the telomeric functions (4). Telomeric repeat DNA consists of a species-specific length of double-stranded DNA and ends with a 3'-end overhang. In addition, due to the sequence of the repeats, the strand composing the chromosomal 3'-end is usually rich in guanosines (referred to as the G-rich strand, 5). As a consequence of the end-replication problem, the maintenance of a functional tract of telomeric DNA in most systems depends on a specialized reverse transcriptase, called telomerase (1,6). In human cells, telomerase activity is readily detectable in most transformed cell lines, cancer tissue cells and in germ line cells, whereas there is little activity in normal somatic cells (see 7 for a review). This correlation between telomerase activation and tumorigenic transformation of cells has recently been corroborated with cell culture experiments (8). Thus, the telomerase enzyme represents a promising and intensely studied target for anti-cancer therapies (9). In this respect, defined and tractable systems would be of great help to investigate the properties of telomerase.

The telomerase holoenzyme is a ribonucleoprotein (RNP) consisting of a number of proteins and an RNA molecule. The essential core elements, the catalytic protein subunit and the associated RNA, have been identified and cloned from a variety of organisms, including humans (hTERT, hTR) and the yeast *S. cerevisiae* (Est2p, TLC1)(see 10,11 for reviews). *In vitro* studies of reconstituted human enzyme have shown that these two elements alone suffice to provide activity, but the experiments also indicated that additional factors may be needed for *in vivo* maturation, assembly, recruitment and/or activation of the RNP (12-15). Furthermore, genetic studies in yeast have identified several factors that are essential for *in vivo* activity of telomerase at the telomeres (Est1p, Est3p, Cdc13/Est4p, and at least one ATM/ATR related kinase, (16,17), suggesting that the *in vivo* regulation of telomerase is much more complex than the current *in vitro* assays can recapitulate.

Insights regarding the *in vivo* regulation of human telomerase could be obtained by studying human telomerase in a heterologous system, such as yeast. Telomere structure and a number of the known telomerase associated factors appear conserved between human and yeast cells. For example, the species-specific double-stranded telomeric repeats are bound by related proteins (scRap1p, hRAP1/TRF2, TRF1) and these proteins appear to regulate telomere length maintenance in both systems (18,19). In addition, there are clear homologies between the human and yeast catalytic proteins hTERT and Est2p, respectively (10). More recently, human proteins sharing similarities to the yeast telomerase-associated protein Est1p also have been identified and the human hPOT1 protein may be a functional analogue of the yeast Cdc13/Est4p (see 20, for review). In addition to these structural similarities, yeast telomerase will elongate telomeric substrates containing human repeats (21,22). Furthermore, substitutions in the yeast telomerase RNA template region to direct the synthesis of vertebrate-specific repeats results in telomeres containing vertebrate repeats (23). Such so called humanized telomeres in yeast apparently are stable and the mitotic stability of the chromosome containing the human telomeric repeats is not affected (24,25). Finally, the

human telomerase RNA can be stably expressed in yeast (26) and a telomerase activity synthesizing human repeats can be documented by immunoprecipitation from extracts of yeast cells coexpressing hTR and hTERT (27,28). However, despite the functional similarities of the telomere structures, telomerase and associated proteins between human and yeast, it remained unknown whether human telomerase could functionally complement the yeast telomerase in mediating telomere function and cell survival.

Here we report our efforts to reconstitute in yeast a functional human telomerase that is active on yeast telomeres. The results demonstrate that reprogramming the yeast telomerase RNA to template human repeats establishes telomeric end-structures comprising a relatively long 3'-overhang of the humanized G-rich strand. Therefore, a suitable substrate for the human telomerase can be generated on yeast telomeres. Furthermore, we show that the expressed human telomerase subunits do form an active complex and localize to the nucleus. However, despite the presence of all these required prerequisites and the expression of two of the human hEST1 homologues in our yeast system, we were unable to detect any polymerization activity of the human enzyme on yeast telomeres.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids and Yeast Strains.

The pTLC1TRP and pTLC1hTRP plasmids were generated in the pRS314 backbone (29). First, pTLC1TRP contains a 2,9 kb NdeI-EcoRI fragment isolated spanning the *TLC1* gene and isolated from pAZ1 (30) in the unique EcoRI site. Second, a 1 kb StuI-NsiI fragment of the *TLC1* gene in pTLC1TRP was replaced by the corresponding fragment isolated from pTLC1h (23). The resulting plasmid, pTLC1hTRP, thus contained the yeast *TLC1* gene with the template region converted to template human repeats. pEST2-LYS2 contains a 4.4 Kb BamHI fragment with the *EST2* gene inserted into the SmaI site of pRS317 (31). The p413-hTR-ADE2 plasmid was created by replacing the original *HIS3* marker gene with the *ADE2* marker gene in p413-hTR (28). Plasmid pEGKT-hTERT (*URA3* marker gene) was described previously (28).

p426/CDC13_{DBD}-hTERT (*URA3* marker gene) was generated using a XbaI CDC13_{DBD} fragment fused to a 3.4 Kb XbaI-HindIII hTERT fragment from pEGKT-hTERT (28). The resulting SpeI-HindIII CDC13_{DBD}-hTERT fusion fragment was then cloned into the yeast expression vector p426-GAL1 (32) digested with SpeI and HindIII. pRS422-hTR (*ADE2* marker gene) was produced by cloning a SacI-XhoI fragment from p413-hTR (28) into the pRS422 vector (33) digested with SacI and XhoI. p425-HA2-hEST1A (*LEU2* marker gene) was constructed by inserting a PmeI restriction fragment containing HA2-hEST1A derived from pcDNA3.1-HA2-hEST1A (Snow et al. 2003) into p425-GAL1 (32). p424-HA2-hEST1B (*TRP1* marker gene) was constructed in the same way in p424-GAL1 (32). Note that the expression of the GST-hTERT, CDC13_{DBD}-hTERT, hEST1A and hEST1B proteins as well as the hTR RNA are under the control of the galactose inducible GAL1-promoter. When appropriate, proper plasmid constructs were confirmed by sequencing (fusion proteins and promoter insertions).

RWY12 (*Mata*, *ura3-52*, *lys 2-801*, *ade2-101*, *trp1-Δ1*, *his3-Δ200*, *leu2-Δ1*, *tlc1Δ::LEU2*, VR-ADE2-T) containing pAZ1 (*TLC1*, *URA3*)(34) was the strain used for the long term

telomere sequence replacement study. After selection of cells that had lost pAZ1 on 5-FOA plates, pTLC1TRP or pTLC1hTRP plasmids were introduced. One wild-type (pTLC1TRP-containing clone) and three independent pTLC1hTRP-containing clones respectively were restreaked on selective media for long-term sequence analysis (~2500G).

BY4705 (*Mata/Mata α* , *ade2 Δ ::hisG/ade2 Δ ::hisG*, *his3 Δ 200/his3 Δ 200*, *leu2 Δ 0/leu2 Δ 0*, *lys2 Δ 0/lys2 Δ 0*, *met15 Δ 0/met15 Δ 0*, *trp1 Δ 63/trp1 Δ 63*, *ura3 Δ 0/ura3 Δ 0*) (33) was the host strain for the complementation study. *TLC1* disruption by KanMx4 was performed by one step PCR gene replacement (33). The deletion of the *EST2* gene was performed by gene displacement using an EcoRI-BamHI fragment containing the *EST2* gene in which an internal 1.4 kb HpaI fragment was replaced by *HIS3*. The first 316 bp and the last 919 bp were homologous to the *EST2* gene. All deletions were confirmed by Southern blotting (data not shown). The resulting BY4705 *tlc1 Δ ::KanMx4/TLC1*, *est2 Δ ::HIS3/EST2* strain was then sporulated and selected spores deleted for both genes were first transformed with yeast telomerase plasmids pTLC1TRP (or pTLC1hTRP) and pEST2-LYS2 for maintaining survival. Then human telomerase plasmids pRS422-hTR and pEGKT-hTERT or p426/CDC13_{DBD}-hTERT were introduced. Complementation tests were performed by loss of different plasmids and observation of survival of cells by replating on selective media. Strain YPH499 has been described previously (29) Yeast and bacterial transformations and yeast genetic analyses were performed using standard methods (35-37).

Isolation and detection of telomeric DNA.

Genomic DNA isolation, digestion with XhoI and gel analyses under non-denaturing conditions were described previously (34). Detection of single-stranded human telomeric repeats were performed with a ³²P-labelled (C₃TA₂)_n oligonucleotides. DNA was then denatured and transferred to a Hybond-N+ membrane (Amersham Pharmacia biotech) and hybridized to ³²P(C₃TA₂)₃ or ³²P(C₁₋₃A) (5'-CCCACCACACACCCACACCC-3') oligonucleotides to detect double-stranded human and yeast telomeric repeats respectively. For single strand (ss) and double strand (ds) controls for human telomeric DNA detection, pTLC1hTRP was linearized by PstI and either denatured prior to loading on the gel or used directly. pTLC1hTRP contains a tract of 19 bp of human telomeric repeats as targets. Alternatively, p16R containing 1,6 kb of human telomeric repeats was used (38). Linearized double-stranded and single-stranded phagemid DNA derived from pGT55 were respectively used as single-stranded (ss) and double-stranded (ds) controls for yeast telomeric DNA (34). In all gels, end-labeled 1 kb ladder DNA (Gibco-BRL) was used as a DNA size standard.

Telomere cloning and sequence analysis.

Chromosome V-R telomeres, which are linked to *ADE2* in the RWY12 strain, were amplified using an established protocol (39) with slight modifications. Briefly, genomic DNA from humanized cells was isolated after indicated numbers of generations of growth and resuspended in 50 μ l of 5 mM Tris-HCl, pH 8.0. Tailing of 3' ends was performed by denaturing 100 ng of genomic DNA for 5 min at 95°C, then tailing buffer complemented with 2 mM dCTP and 1 U of terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT, Amersham Pharmacia Biotech) was added and the reaction incubated for 30 min. The

TdT enzyme was heat-inactivated at 65°C for 10 min and at 94°C for 5 min. Tailing reactions were then transferred to puReTaq™ Ready-To-Go™ PCR Beads (Amersham Biosciences) containing the following primers at 0.8 pmol/μl, dG₁₈-*Bam*HI (5'-CGGGATCCG₁₈-3') and DIA5-1 (5'-GTGAGCGGATAACAATTTACACAGTCTAGATGTCCGAATTGATCCCAGAGTAG-3'). 3' end amplification was performed with an initial denaturation at 94°C for 2 min followed by 45 cycles with 20 sec denaturation (94°C), 12 sec annealing (62°C) and 20 sec extension (72°C), and a final extension step of 5 min at 72°C. PCR reactions were then run on 2 % agarose gels, bands excised, purified and cloned into the pGEM-T vector (Promega). Plasmids were sequenced using M13 forward primer and SequiTherm EXCEL™ II DNA sequencing kit on a LiCor 4200 DNA-sequencer. Sequencing data were analysed with GraphPad Prism software.

hTERT immunolocalization

Yeast cells used for the complementation study were grown to OD_{660nm} = 0.5 and fixed with 5% formaldehyde for 10 min. The cells were resuspended in PPBMG (100 mM potassium phosphate buffered at pH 6.5, 0.5 mM MgCl₂) plus 5% formaldehyde, incubated for 30 min and washed three times in B buffer (1.2 M sorbitol, 100 mM potassium phosphate buffered at pH 7.5). Rabbit anti-hTERT polyclonal antibody (1/200) (a generous gift from Lea Harrington) and a monoclonal mouse anti-Nop1p (1/10000) (40) antibodies were diluted in PBS containing 1 mg/ml BSA, applied to the cells and incubated for 2 hours at room temperature. Cells were then washed several times with PBS containing 1mg/ml BSA. As secondary antibodies, Texas Red conjugated goat anti-rabbit antibodies and Oregon Green conjugated goat anti-mouse antibodies (Molecular Probes, Eugene, Oregon) were diluted 1/1000 and applied for 2 hours to the cells. After several washes with PBS containing 1mg/ml BSA, DAPI (1 μg/ml in PBS) was added for 2 min, and the cells were washed again 3 times with PBS. Slides were mounted and cells were visualised with an Olympus IX70 epifluorescent microscope.

Human protein expression, western analyses and telomerase activity

Expression of hTERT and hTR, determination of human telomerase activity and western analyses for the hTERT proteins were performed as described previously (27). Yeast strains containing either p425-HA2-hEST1A or p424-HA2-hEST1B plasmids were grown on selective medium containing 2% glucose or galactose to OD_{660nm} 0.5-3.0. Protein extracts were prepared as described (41). Samples were separated by 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to Hybond C nitrocellulose membrane (Amersham) and probed with an Anti-HA mouse monoclonal antibody (Boehringer Mannheim), followed by secondary detection with a horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse antibodies (Amersham).

RESULTS

Previous reports suggested that a functional complementation of the yeast telomerase by the human enzyme may be possible. First, changing the template region of the yeast telomerase RNA into one that directs synthesis of human repeats results in mitotically stable yeast telomeres carrying human telomeric repeats (23-25). Second, the core subunits of the human telomerase can be expressed in yeast and assemble to form an active enzyme (27,28). However, none of these studies examined functional complementation of the yeast telomerase by expression of the human core components.

Creating the substrate and a molecular analysis of humanized telomeres.

In vitro, ciliate telomerase requires single-stranded DNA with a 3'-end as a substrate (42). A 3'-overhang at the very distal end of chromosomal DNA is a conserved feature in many species, including yeast and humans (3). For telomerase-mediated elongation, the sequence of the overhang appears to be less important as long as there are some nucleotides to anneal with the template region. For example, yeast telomerase can use human and various ciliate repeat DNA as substrate (21,22,43,44) and, at least *in vitro*, human telomerase can also use various substrates (45). To ensure that a suitable substrate for the human enzyme can be generated in yeast, we used a yeast telomerase RNA that carries human repeats at the template site (pTLC1hTRP). Previous reports showed that when this RNA replaces the endogenous wild-type yeast telomerase RNA, human telomeric repeats are incorporated into yeast chromosomal telomeres (23). We repeated this experiment and analyzed the incorporation of human repeats into telomeric DNAs and, in particular, into the 3'-overhangs. Single-stranded overhangs on telomeres can be detected using a non-denaturing in-gel hybridization technique, followed by detection of all telomeric repeat DNA in the same gel, once the DNA is denatured (34). Yeast cells expressing *Tlc1h* as the sole telomerase RNA were grown on plates for up to 2,500 generations, genomic DNA isolated at various intervals, digested with the *Xho*I restriction enzyme and analyzed as described above. Due to a conserved subtelomeric Y'-element that is present on many yeast telomeres, *Xho*I liberates a diagnostic terminal restriction fragment (TRF) of about 1,2 kb, of which about 300 bp correspond to the terminal repeat DNA. Various other TRFs of larger sizes are also detected in this analysis and these correspond to non-Y' telomeres (34). Single-stranded overhangs carrying human repeats of the G-rich strand can indeed be detected if a C-rich strand oligo is used as a probe (Fig. 1A). Conversely, single-stranded C-rich DNA was never detected (data not shown). The signal detected corresponded to terminal extensions, since it was abolished if the DNA was treated with *E.coli* Exonuclease I prior to analysis (data not shown). Intriguingly, the signal intensities for the human repeats increased with increasing numbers of generations, which suggested that the overhangs have a tendency to lengthen over time. In order to examine whether yeast specific repeats are part of the overhang, the same DNA was also subjected to non-denaturing gel analysis using a yeast specific C-strand probe. While a weak signal for G-strand extensions can be detected on DNA derived from wt *TLC1* harbouring cells, no such signal was detected on DNA derived from *Tlc1h*-harbouring cells (Fig. 1E).

To examine the approximate size of the G-strand overhangs in these strains, we used probes of differing lengths and increasing washing stringencies with the non-denaturing in gel procedure (38). The longest probe used (30 nt) remained hybridized to

the DNA extracted from yeast to virtually the same extent as it remained hybridized to a positive control containing 1,6 kb of repeats (Fig. 2). However, the signals for a control single-stranded DNA containing a shorter tract (19 nt on pTLC1hTRP) were lost after washing the gels at 55°C (Fig 2, right, middle panel, lane 4 open arrow). This suggests that the entire length of the probe could hybridize on G-rich overhangs, indicating that after culturing of about 100 generations, most humanized overhangs in yeast are longer than 24 nt long.

After the non-denaturing analyses, the DNA in the gels shown in Fig. 1A was denatured and consecutively rehybridized to probes detecting all human G-strand and C-strand repeats (Fig. 1B, data not shown). Consistent with what has been reported, TRF-lengths of the *Tlc1h*-harbouring strains are shorter than wt and remained quite stable for at least 2,500 generations (Fig. 1B, C). However, signal intensities for human specific repeats of both strands tended to increase over the course of the experiments (Fig. 1B, data not shown). Conversely, signal intensities obtained with a probe detecting all yeast specific repeats clearly diminished in these samples (Fig. 1C). This apparent progressive replacement of yeast telomeric repeats with human repeats had been noted previously (24,25), but not examined in detail. We investigated this effect by cloning and sequencing the telomeric repeats adjacent to a marked telomere in the *Tlc1h*-harbouring strain at various times of outgrowth (Fig. 3). Overall, this sequencing effort confirmed the qualitative impressions from the hybridization experiments (composite bars, Fig. 3B). For telomeres containing both human and yeast repeats, the human repeats were distal to the yeast repeats in virtually all cases (data not shown, 23). In no clone did we find a complete replacement however, even after 2,500 generations. On all clones derived from cells grown for more than 1,200 generations, a minimal tract of about 50 bp of yeast specific repeats remained. Surprisingly, we found a significant number of telomeres that did not contain any human specific telomeric repeats, even after 150 generations of growth in the presence of *Tlc1h*. As opposed to the telomeres harbouring a mixture of repeats, the telomeres with yeast repeats only decreased in size over time (white bars, Fig. 3B).

These results demonstrate that over the course of outgrowing yeast cells harbouring *Tlc1h* as sole telomerase RNA, there is a progressive loss of the yeast specific repeats on chromosomal telomeres. This loss is counterbalanced by a progressive increase of human repeats and overall, sequence replacement is very slow, reaching a stable state only after 1,200 generations. In addition, the single-stranded overhangs in such strains are composed of human G-strand repeats that are mostly longer than 24 nt and these overhangs also appear to increase in size during outgrowth. Thus, the data suggests that an adequate substrate for the human telomerase can be generated in yeast.

Expression and localization of the human enzyme.

We next constructed a yeast strain that carried deletions of both the *EST2* and *TLC1* genes. Yeast cells devoid of telomerase activity are able to grow for about 50-70 generations, during which time telomeric repeat DNA is eroded (46). Increasing telomere dysfunction however leads to a growth arrest after such outgrowth. Therefore, our starting strains also contained plasmids carrying *TLC1* and *EST2* (see Materials and Methods). For all assays, starting strains carrying pTLC1hTRP, the *TLC1* gene with

humanized template, or pTLC1TRP, a wild-type copy of *TLC1*, in combination with the pEST2-LYS2 were used in parallel. Into these strains, we introduced yeast plasmids expressing hTERT as a fusion protein with GST (pEGKT-hTERT) or as a fusion protein with the Cdc13p DNA-binding domain (p426/CDC13_{DBD}-hTERT) in combination with an hTR expressing plasmid. First, we assessed whether the human components were expressed and could reconstitute a detectable telomerase activity in yeast extracts (Fig. 4). Both, the CDC13_{DBD}-hTERT and the GST-hTERT fusion proteins were expressed in yeast, since a signal corresponding to their respective predicted MW was detected by Western analysis (Fig. 4B). In addition, combinations of hTR-expressing plasmids with plasmids expressing either hTERT-fusion protein resulted in detectable Telomere Repeat Amplification Protocol (TRAP) signals (Fig. 4A). Although the signals were not very strong, particularly when the CDC13_{DBD}-hTERT construct was used, one must note that in contrast to previous analyses (27,28), the assays were performed using crude yeast cell extracts. Moreover, according to the Western analysis, CDC13_{DBD}-hTERT may be less efficiently expressed than GST-hTERT in yeast. We conclude that expression of either fusion protein in combination with hTR is able to yield an active human telomerase.

In vivo, telomerase substrates, or chromosome ends, are located in the nucleus, thus it was essential to assess whether the expressed human telomerase could be imported into the yeast nucleus. We localized the hTERT fusion proteins using indirect immunofluorescence and an antibody against hTERT (Fig. 5). Cells were also stained with DAPI as an indicator for the nucleus and an antibody against Nop1p, which marks the nucleolus. The hTERT antibody creates low levels of background signal in these assays (Fig. 5A). Clearly, both fusion proteins were found predominantly in the nucleus, yielding a spotted pattern throughout the nucleoplasm (Fig. 5B, C). Remarkably little of the protein remained detectable in the cytoplasm. Although we did not co-localize the hTR RNA, we assume that it is associated with the protein in the nucleus. Thus, it is reasonable to suggest that the expressed human telomerase components can assemble into an active complex that localizes to yeast nuclei.

The human enzyme does not complement the yeast telomerase.

Using our starting strains that contained the core components of human and yeast telomerase on four different plasmids, we selected for strains that had lost either of the components and assayed for *in vivo* complementation. Complementation of the yeast enzyme was scored as the ability of yeast cells to grow past the point at which telomerase-negative yeast cells encounter a growth crisis. Obviously, strains that retained both yeast components always displayed that phenotype, irrespective of whether they also contained other plasmids (Table 1). Such strains served as positive controls. Strains initially containing pTLC1TRP and that had lost all four plasmids did display the expected growth arrest after about 70 generations and served as negative controls. Remarkably, strains that initially contained the pTLC1hTRP plasmid and thus contained the humanized telomeres before plasmid loss never yielded colonies without plasmids containing the genes for the yeast telomerase core components. We infer that growth arrest was occurring at less than 20 generations and it is possible that such cells die extremely rapidly (Table 1, right). This accelerated senescence could be attributed to the initially shorter length of the telomeres in these strains (Fig. 1) and possibly an

accelerated loss of human telomeric repeats. As can be concluded from the results summarized in Table 1, following the loss of the plasmids for the expression of the yeast telomerase components, no combination-of the remaining plasmids allowed the yeast cells to grow past the normal growth arrest point. Previous reports indicate that the action of yeast telomerase at the telomeres is independent of additional co-factors such as Est1p, when Est2p is fused to the Cdc13p DNA-binding domain (47). As we initially did not co-express human versions of such cofactors, we speculated that fusing hTERT with CDC13_{DBD} might bypass a requirement for such co-factors. However, targeting hTERT to the telomeres by expression of a CDC13_{DBD}-hTERT fusion protein did not rescue a yeast telomerase deficiency. Of note, the CDC13_{DBD}-hTERT fusion protein used here does complement the temperature sensitive growth defect of a strain harbouring a *cdc13-1* mutation, demonstrating that the Cdc13p included in CDC13_{DBD}-hTERT is functional (data not shown). In addition, chromatin immunoprecipitation experiments have shown that Cdc13p is bound to humanized telomeres to the same extent if not more than to wt telomeres (24). These data strongly suggest that the failure to provide human telomerase activity onto the humanized telomeres is not due to a general failure to target the hTERT protein to the telomeres. Finally, we also expressed hEST1A or hEST1A and hETS1B together with the core human telomerase components. Again, although the hEST proteins could be expressed from our yeast vectors, as assessed by Western analysis (Fig. 4C), no complementation of the yeast telomerase deficiency was observed (Table 1).

We concluded that despite the expression of the two essential human telomerase core components in yeast, their assembly to form an active complex *in vitro* and the localization of hTERT (and presumably hTR) to the nucleus, human telomerase cannot functionally replace yeast telomerase.

DISCUSSION.

The telomerase enzymes of particular species appear to have a relatively relaxed sequence requirement in terms of their substrates *in vitro* and *in vivo*. In addition, recent results showed that the yeast telomerase RNA can be reprogrammed to add vertebrate-specific repeats onto the ends of yeast telomeres (23-25). These features prompted us to ask whether a functional complementation of the yeast core components by the human counterparts was possible. Such an exogenous reconstitution system in yeast cells would be an invaluable tool for an in depth analysis of telomerase function. However, none of the core component combinations tested in this study yielded evidence for a functional human telomerase activity at the endogenous yeast telomeres (Table 1). One could argue that the human telomerase enzyme can be active at yeast telomeres, but that the actual amounts of active RNPs reached in our experiments are too low for maintaining stable repeat tracts. We have shown previously that the co-expressed RNA and hTERT components do assemble into an active RNP with high specificity and that this active RNP can be purified by immunoprecipitations (28). Nevertheless, we also sequenced a number of telomeres cloned from the parent strain harbouring both telomerases. If there was a very low level of human telomerase activity on yeast telomeres, we would have expected to find occasional and perhaps isolated

human repeats imbedded in the yeast repeats. However, no such repeats were found amongst more than 1.5 kb of yeast telomeric sequences, representing more than 10 independent telomeres (data not shown). Given that the core components of human telomerase expressed in yeast can assemble to yield an enzyme with detectable activity *in vitro* (28, Fig. 4), these results strongly suggest that additional co-factors are required for the assembly of an active enzyme at the site of synthesis.

The yeast Est1p and Est3p proteins are examples of such cofactors in yeast: while these proteins are not essential for initial cell growth and *in vitro* telomerase activity, they are essential for *in vivo* telomerase activity (48,49). In addition, one of the non-essential functions of the yeast Cdc13p protein is such a cofactor role (49). We addressed the requirement for cofactors by expressing an hTERT-CDC13_{DBD} fusion protein or by co-expressing two of the recently identified human *EST1* orthologues; however these cofactors were not sufficient to reconstitute human telomerase function at yeast telomeres (data not shown). Therefore, it is reasonable to suggest that additional components of the human enzyme might be necessary for *in vivo* activity of the enzyme at the heterologous telomere. These additional components could include known human telomere-associated proteins such as hPOT1 or the complexes assembled around the TRF1 and TRF2 proteins (18). Moreover, it is entirely possible that essential co-factors for *in vivo* activity of the human telomerase remain to be discovered. Lastly, regulation of human and yeast telomerase and telomere function may be sufficiently distinct to prevent functional action of human telomerase at yeast telomeres.

In vitro, the telomerase substrate sequence requirements are not stringent; however, we speculated that the human enzyme may require vertebrate specific repeats *in vivo*. By reprogramming the yeast telomerase RNA, we found that a vertebrate-specific substrate can be generated in yeast and that the overhangs in such strains mostly are longer than 24 nt (Fig. 2). Upon long-term culturing, these overhangs apparently lengthen, thereby in principle providing an adequate substrate for human telomerase. While the essential yeast capping protein Cdc13p has a lowered affinity for single-stranded vertebrate repeats (50,51), it is able to bind them *in vivo* and the relatively long repeat tracts reported here are consistent with the observed increase in Cdc13p binding at such telomeres (24).

The fine-structure analyses and the sequencing of telomeres in yeast strains expressing a humanized yeast telomerase RNA revealed a pattern of sequence replacement over many generations (Fig. 3). Yeast telomeric repeats are slowly and gradually replaced by human repeats in such strains, reaching a plateau after about 1,200 generations. At this point, all telomeres sequenced still retained about 50-bp of yeast specific repeats (Fig. 3), and all of these sequences encompass at least two Rap1p-binding sites (data not shown). Although recent results have shown that yeast telomeres containing only vertebrate repeats can be mitotically stable (24,25), complete replacement of yeast repeats appears not to occur *in vivo*, at least within 2,500 generations of growth (Fig. 3). These results are consistent with telomeric repeat turnover experiments in another yeast, *Kluyveromyces lactis*, where a similar resistance to turnover for the innermost repeats has been observed (52).

Most intriguingly, our sequencing efforts also revealed that in such strains, there are telomeres with about 70 bp of entirely yeast repeats even after 150 generations of

growth in the presence of a humanized yeast telomerase (Fig. 3). In the absence of telomerase activity *in vivo*, yeast telomeres shorten by about 3-5 bp per end and generation such that they reach a growth arrest due to deficient telomeres after about 70 generations (53). Therefore, telomeres with only yeast repeats after 150 generations of growth in the presence of *Tlc1h* are difficult to explain solely with the premise that the humanized telomerase has never acted on them. It is possible that in the particular situation created here, telomeric sequence replenishment by recombination is more effective, which would result in a lower loss rate. Alternatively, the entirely yeast repeat telomeres found after 150 generations could be the result of consecutive sequence addition and sequence loss events. The added sequences would have been vertebrate repeats and while they were present, the internal block of yeast repeats were protected from further gradual losses. Yet, in this scenario, the complete distal block of vertebrate repeats would have to be lost at a surprisingly high frequency to expose only the yeast repeats. One interpretation of the data would stipulate that telomere rapid deletion (TRD) occurs at an extremely high rate in these strains. TRD has been described as a one-step intrachromatid deletion event involving the distal single-stranded overhang and the proximal double-stranded portion of the telomeres (54). TRD is controlled by Rap1p-mediated telomere length control and the progressive losses of Rap1p binding sites from the telomeres in the *Tlc1h* carrying strain may allow an increased rate of TRD. In addition, the precision of TRD events is lost in *rap1^t* mutants, contributing to an increased heterogeneity of telomeric repeat tracts (54), a feature that we also observe during long-term culturing of cells (Figs. 1, 3). However, overall length heterogeneity is less pronounced than in *rap1^t*-cells, arguing that Tbf1p, which will bind the vertebrate telomeric repeats (24), can impose a Rap1p-independent telomere length regulation (25). Finally, TRD occurs at quite high frequency during meiosis, even in wild-type cells (A. Lustig, personal communication). One could therefore invoke the possibility that catastrophic meiotic TRD may be the cause for the severe meiotic defects displayed by yeast strains carrying telomeres with vertebrate telomeric repeat tracts (24). Alternatively, the abrupt losses of the distal vertebrate telomeric repeats could be the result of direct degradation events. However, such degradation events appear to be rare in strains harbouring the yeast Ku-proteins and it has been reported that the yeast Ku-complex is still bound to telomeres harbouring vertebrate repeats (24). It could be argued that TRD- or degradation-mediated loss of vertebrate repeats would leave a few repeats at the yeast-vertebrate repeat boundary, which we should have detected by the sequencing effort. However, re-elongation of such shortened telomeres could be compared to telomere healing and it has been shown that vertebrate repeats are very poor substrates for healing events by yeast telomerase (55). Therefore, such ends may be subject to continued progressive sequence losses until all the vertebrate repeats are lost and the most effective substrate for re-elongation is exposed. Consistent with this idea, most efficient substrates for telomere healing include about 40-50 bp of yeast repeats comprising two Rap1p-binding sites (55), and this corresponds well with what we found to be the obligatory sequences left on yeast telomeres after outgrowth in the presence of *Tlc1h* (Fig. 3). We therefore speculate that an innermost sequence of about 50 bp comprising two Rap1p binding sites is resistant to telomere turnover events and therefore may constitute the preferred minimal functional telomeric repeat tract for *S. cerevisiae*.

Taken together, the results reported here demonstrate that the core components of human telomerase can be expressed in yeast, are properly localized to the nucleus and assemble to form an active enzyme detectable in crude extracts. Moreover, relatively long single-stranded overhangs of vertebrate specific can be generated in yeast by reprogramming the yeast telomerase RNA, thereby providing the suitable substrate for the human enzyme. However, the human enzyme is not active on yeast telomeres *in vivo*, even when targeted to the telomeres by fusing hTERT to Cdc13p or by co-expressing human orthologues of Est1p. Finally, telomeres carrying a mix of yeast and vertebrate specific repeats may undergo frequent rapid deletions of the distal vertebrate repeats. These turnover events however never remove the entire yeast specific tract and about 50 bp, encompassing two Rap1p binding sites, always remain at the proximal end. The system would therefore be ideally suited to study the mechanistic details for TRD and telomere sequence turnover, mechanisms that has been proposed to contribute significantly to telomere behaviour in mammalian cells (54).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank K. Henning, V. Lundblad and L. Harrington for generously providing plasmids and antibodies used in this study. We are also indebted to M. Catala and S. Abou-Elela for help in the microscopic analyses. A. Lustig and V. Zakian communicated results prior to publication and helped us with insightful discussions. This work was supported by a grant of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to R.J.W. (MOP12616), and a grant from CIHR to C.A. (MOP14026). F.B. was the recipient of a doctoral award from the CIHR. R.J.W. is a chercheur national of the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). CA is a chercheur-boursier of the FRSQ and a recipient of a Boehringer Ingelheim (Canada) Young Investigator Award.

REFERENCES

1. Blackburn, E.H. (2000) The end of the (DNA) line. *Nat Struct Biol*, **7**, 847-850.
2. Lundblad, V. (2001) Genome instability: McClintock revisited. *Curr Biol*, **11**, R957-960.
3. Chakhparonian, M. and Wellinger, R.J. (2003) Telomere maintenance and DNA replication: how closely are these two connected? *Trends Genet*, **19**, 439-446.
4. Sandell, L.L. and Zakian, V.A. (1993) Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell*, **75**, 729-739.
5. Wellinger, R.J. and Sen, D. (1997) The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *Eur J Cancer*, **33**, 735-749.
6. Greider, C.W. and Blackburn, E.H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*, **43**, 405-413.
7. Shay, J.W. and Bacchetti, S. (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, **33**, 787-791.
8. Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W. and Weinberg, R.A. (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, **400**, 464-468.
9. Huard, S. and Autexier, C. (2002) Targeting human telomerase in cancer therapy. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, **2**, 577-587.
10. Kelleher, C., Teixeira, M.T., Forstemann, K. and Lingner, J. (2002) Telomerase: biochemical considerations for enzyme and substrate. *Trends Biochem Sci*, **27**, 572-579.
11. Aisner, D.L., Wright, W.E. and Shay, J.W. (2002) Telomerase regulation: not just flipping the switch. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 80-85.
12. Weinrich, S.L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V.M., Holt, S.E., Bodnar, A.G., Lichtsteiner, S., Kim, N.W., Trager, J.B. *et al.* (1997) Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet*, **17**, 498-502.
13. Holt, S.E., Aisner, D.L., Baur, J., Tesmer, V.M., Dy, M., Ouellette, M., Trager, J.B., Morin, G.B., Toft, D.O., Shay, J.W. *et al.* (1999) Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev*, **13**, 817-826.
14. Licht, J.D. and Collins, K. (1999) Telomerase RNA function in recombinant Tetrahymena telomerase. *Genes Dev*, **13**, 1116-1125.
15. Harrington, L. (2003) Biochemical aspects of telomerase function. *Cancer Lett*, **194**, 139-154.
16. Evans, S.K. and Lundblad, V. (2000) Positive and negative regulation of telomerase access to the telomere. *J Cell Sci*, **113**, 3357-3364.
17. Ritchie, K.B., Mallory, J.C. and Petes, T.D. (1999) Interactions of TLC1 (which encodes the RNA subunit of telomerase), TEL1, and MEC1 in regulating telomere length in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **19**, 6065-6075.
18. de Lange, T. (2002) Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*, **21**, 532-540.
19. Lundblad, V. (2000) Molecular biology. Telomeres keep on rappin'. *Science*, **288**, 2141-2142.
20. Lundblad, V. (2003) Telomere replication: an est fest. *Curr Biol*, **13**, R439-441.

21. Cross, S.H., Allshire, R.C., McKay, S.J., McGill, N.I. and Cooke, H.J. (1989) Cloning of human telomeres by complementation in yeast. *Nature*, **338**, 771-774.
22. Riethman, H.C., Moyzis, R.K., Meyne, J., Burke, D.T. and Olson, M.V. (1989) Cloning human telomeric DNA fragments into *Saccharomyces cerevisiae* using a yeast-artificial-chromosome vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 6240-6244.
23. Henning, K.A., Moskowitz, N., Ashlock, M.A. and Liu, P.P. (1998) Humanizing the yeast telomerase template. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5667-5671.
24. Alexander, M.K. and Zakian, V.A. (2003) Rap1p telomere association is not required for mitotic stability of a C(3)TA(2) telomere in yeast. *Embo J*, **22**, 1688-1696.
25. Brevet, V., Berthiau, A.S., Civitelli, L., Donini, P., Schramke, V., Geli, V., Ascenzioni, F. and Gilson, E. (2003) The number of vertebrate repeats can be regulated at yeast telomeres by Rap1-independent mechanisms. *Embo J*, **22**, 1697-1706.
26. Dez, C., Henras, A., Faucon, B., Lafontaine, D., Caizergues-Ferrer, M. and Henry, Y. (2001) Stable expression in yeast of the mature form of human telomerase RNA depends on its association with the box H/ACA small nucleolar RNP proteins Cbf5p, Nhp2p and Nop10p. *Nucleic Acids Res*, **29**, 598-603.
27. Bachand, F., Kukolj, G. and Autexier, C. (2000) Expression of hTERT and hTR in cis reconstitutes and active human telomerase ribonucleoprotein. *Rna*, **6**, 778-784.
28. Bachand, F. and Autexier, C. (1999) Functional reconstitution of human telomerase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **274**, 38027-38031.
29. Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.
30. Beeler, T., Gable, K., Zhao, C. and Dunn, T. (1994) A novel protein, CSG2p, is required for Ca²⁺ regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **269**, 7279-7284.
31. Sikorski, R.S. and Boeke, J.D. (1991) In vitro mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast. *Methods Enzymol*, **194**, 302-318.
32. Mumberg, D., Muller, R. and Funk, M. (1994) Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5767-5768.
33. Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. and Boeke, J.D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, **14**, 115-132.
34. Dionne, I. and Wellinger, R.J. (1996) Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13902-13907.
35. Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A. and Schiestl, R.H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*, **20**, 1425.

36. Rose, M.D., Winston, F. and Hieter, P. (1990) *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
37. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
38. McElligott, R. and Wellinger, R.J. (1997) The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *Embo J*, **16**, 3705-3714.
39. Forstemann, K., Hoss, M. and Lingner, J. (2000) Telomerase-dependent repeat divergence at the 3' ends of yeast telomeres. *Nucleic Acids Res*, **28**, 2690-2694.
40. Aris, J.P. and Blobel, G. (1988) Identification and characterization of a yeast nucleolar protein that is similar to a rat liver nucleolar protein. *J Cell Biol*, **107**, 17-31.
41. Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. and Schiebel, E. (1999) Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast*, **15**, 963-972.
42. Lingner, J. and Cech, T.R. (1996) Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10712-10717.
43. Shampay, J., Szostak, J.W. and Blackburn, E.H. (1984) DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature*, **310**, 154-157.
44. Pluta, A.F., Dani, G.M., Spear, B.B. and Zakian, V.A. (1984) Elaboration of telomeres in yeast: recognition and modification of termini from *Oxytricha* macronuclear DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 1475-1479.
45. Morin, G.B. (1989) The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*, **59**, 521-529.
46. Lundblad, V. and Blackburn, E.H. (1993) An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell*, **73**, 347-360.
47. Evans, S.K. and Lundblad, V. (1999) Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science*, **286**, 117-120.
48. Cohn, M. and Blackburn, E.H. (1995) Telomerase in yeast. *Science*, **269**, 396-400.
49. Lingner, J., Cech, T.R., Hughes, T.R. and Lundblad, V. (1997) Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11190-11195.
50. Lin, J.J. and Zakian, V.A. (1996) The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNA-binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13760-13765.
51. Nugent, C.I., Hughes, T.R., Lue, N.F. and Lundblad, V. (1996) Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science*, **274**, 249-252.
52. McEachern, M.J., Underwood, D.H. and Blackburn, E.H. (2002) Dynamics of telomeric DNA turnover in yeast. *Genetics*, **160**, 63-73.
53. Singer, M.S. and Gottschling, D.E. (1994) TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science*, **266**, 404-409.

54. Lustig, A.J. (2003) Clues to catastrophic telomere loss in mammals from yeast telomere rapid deletion. *Nat Rev Genet*, **4**, 916-923.
55. Lustig, A.J. (1992) Hoogsteen G-G base pairing is dispensable for telomere healing in yeast. *Nucleic Acids Res*, **20**, 3021-3028.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Single-stranded overhangs and sequence composition of telomeres in yeast strains expressing *Tlc1h*. Genomic DNA from yeast strains expressing wild type *TLC1* and strains expressing the humanized RNA (*Tlc1h*) was extracted after the strains had been cultured for the indicated numbers of generations (40G to ~2500G). The DNA was digested with *Xho*I and analyzed by non-denaturing in-gel hybridization. Lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13: strains expressing *TLC1wt*. Lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14: strains expressing *Tlc1h*.

(A) The native gel was first hybridized to an end-labelled human telomeric probe ($^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_3$).

(B) DNA in the gel shown in A) was denatured and rehybridized to the same probe.

(C) The probe in B) was washed off and the gel rehybridized to an end-labelled yeast telomeric probe ($^{32}\text{P}(\text{C}_{1-3}\text{A})$).

(D) The same gel shown in panels A-C was rehybridized to a probe specific for the CEN4 region to show about equal loading of the lanes.

(E) Non-denaturing in-gel analysis of the same DNA as shown in A-D, but using the yeast specific C-strand probe first. Lanes 1-7: strains expressing *Tlc1h*. Lanes 8-14: strains expressing *TLC1wt*. Lane 15: genomic DNA derived from a wild type strain (BY4705) without any plasmids.

(F) The DNA in the gel shown in E) was denatured and re-hybridized to a probe specific for CEN4 to control for DNA loading. Lanes 15-17 of the gel shown in A-C, and lanes 16-18 of the gel shown in E contain control DNAs harbouring human telomeric repeats in single-stranded form (H, ss), human telomeric repeats in double-stranded form (H, ds), or a mixture of yeast telomeric repeats in single-stranded and double stranded form (Y, ss+ds). DNA size standard was end-labeled 1kb ladder DNA and sizes are indicated on the left of the gels.

FIGURE 2. Vertebrate G-rich overhangs of at least 30 bases on telomeres of cells carrying *Tlc1h*. Non-denaturing in-gel hybridization was performed with human telomeric probes of various lengths. Shown here are the results obtained with $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_4$ (left) and $^{32}\text{P}(\text{C}_3\text{TA}_2)_5$ (right) as probes. Gels were first washed at 30°C and, after appropriate exposures were obtained, they were rewashed at increasing temperatures as indicated on the side of the panels. Lane 1: DNA derived from a strain carrying wt *TLC1* and grown for 100 generations; Lane 2: DNA derived from a strain carrying *Tlc1h* and grown for 100 generations; Lane 3: Linearized and denatured p16R (positive control with 1,6 kb of vertebrate repeats); Lane 4: Linearized and denatured pTLC1hTRP (positive control with 19 nt of vertebrate repeats). Left: Molecular weight standard. Close arrows indicate the chromosomal terminal restriction fragments (TRFs), open arrows point to the pTLC1hTRP control.

FIGURE 3. Sequence analysis of telomeres in *Tlc1h*-harbouring cells.

(A) For each time-point indicated, three independent PCR reactions were performed, the amplified DNA was cloned and several independent clones sequenced. The table indicates the average (\pm standard deviation) length of telomeric sequences obtained after a given number of generations of culture. In brackets the number of clones

containing TG₁₋₃-sequences only (middle column) or containing both TG₁₋₃ and T₂AG₃ sequences (right column) per total clones sequenced is indicated. Telomere length (far right) is calculated only for the mixed telomeres.

(B) A bar graph representation of the data: white bars: telomeres with yeast sequences only; composite bars: telomeres with both human and yeast repeats. Note that the human repeats were always distal to the yeast repeats (data not shown).

FIGURE 4. Detection of expressed human proteins and telomerase activity.

(A) Telomerase activity was visualized by a TRAP assay using crude yeast extracts derived from cultures harbouring the indicated plasmids. Lane 1: YPH499 cells with pEGKT (empty vector) + p423-hTR; lane 2: YPH499 cells with pEGKT-hTERT + p423-hTR; lane 3: BY4705 *est2Δ/tlc1Δ* cells with p426/CDC13_{DBD}-hTERT + pRS422-hTR + pEST2-LYS2 + pTLC1TRP. IC: Internal control signal for the PCR reaction.

(B) Western analysis using an affinity-purified antibody against hTERT was performed to detect GST-hTERT and CDC13_{DBD}-hTERT proteins (see arrows). Protein extracts analyzed were derived from the same cells as in (A). Note that the hTERT antibody does crosshybridize to some other proteins, but the bands at the predicted MW for the fusion proteins (about 151 kDa for GST-hTERT and 155 kDa for CDC13_{DBD}-hTERT) are specific for the strains expressing them.

(C) HA2-hEST1A and HA2-hEST1B expression as analysed by Western blot of total protein extracted from yeast strains grown in the presence of glucose or galactose. Anti-HA antibody was used as a probe and the expected MWs for HA2-hEST1A and HA2hEST1B are 166 kDa and 122 kDa, respectively. Lanes 1 and 2: yeast strain BY4705 grown in glucose (Glc) or galactose (Gal) containing media (no plasmids); lanes 3 and 4: yeast strain BY4705 with p425-HA2-hEST1A grown on indicated media; lanes 5 et 6: yeast strain BY4705 with p424-HA2-hEST1B; lanes 7 et 8: yeast strain BY4705 with p425-HA2-hEST1A and p424-HA2-hEST1B. The exposure time for lanes containing HA2-hEST1B and HA2-hEST1A + HA2-hEST1B (lanes 5-8) was longer than for HA2-hEST1A alone (lanes 3 and 4). About equal amounts of protein was loaded in each lane and molecular mass markers in kDa are indicated on the left.

FIGURE 5. hTERT is localized to the yeast nucleus. In all panels, the nucleolar protein Nop1p was detected with a mouse monoclonal antibody against Nop1p and Oregon Green-labeled goat anti-mouse antibody; hTERT fusion proteins were detected with a rabbit anti-hTERT polyclonal antibody and Texas-red-conjugated anti-rabbit antibody (red), and the nucleoplasm is represented in blue by DAPI staining.

(A), control strain with no hTERT plasmid (BY4705 *est2Δ/tlc1Δ* cells with pEST2-LYS2, pTLC1hTRP and pRS422-hTR plasmids);

(B), same as (A) plus pEGKT-hTERT plasmid;

(C) same as (A) plus p426/CDC13_{DBD}-hTERT plasmid. Representative fields with four cells are shown and identical results were also observed using strains that harbored *TLC1wt* instead of *Tlc1h* (data not shown).

Table 1

Bah et al, 2003

Plasmids in WT Strain	Plasmids lost	Survival (Gen.)	Plasmids in Humanized Strain	Plasmids lost	Survival (Gen.)
TLC1WT, EST2, hTR, hTERT	none	>150	TLC1h, EST2, hTR, hTERT	none	>150
none	hTR, hTERT, TLC1WT, EST2 (all four)	death 70~90	none	hTR, hTERT, TLC1h, EST2 (all four)	death < 20
TLC1WT, EST2	hTR, hTERT	>150	TLC1h, EST2	hTR, hTERT	>150
TLC1WT	hTR, hTERT, EST2	death 70~90	TLC1h	hTR, hTERT, EST2	death < 20
EST2	hTR, hTERT, TLC1WT	death 70~90	EST2	hTR, hTERT, TLC1h	death < 20
TLC1WT, hTERT	hTR, EST2	death 70~90	TLC1h, hTERT	hTR, EST2	death < 20
EST2, hTR	hTERT, TLC1WT	death 70~90	EST2, hTR	hTERT, TLC1h	death < 20
hTR, hTERT	TLC1WT, EST2	death 70~90	hTR, hTERT	TLC1h, EST2	death < 20
TLC1WT, EST2, hTR, CDC13 _{DBD} -hTERT	none	>150	TLC1h, EST2, hTR, CDC13 _{DBD} -hTERT	none	>150
hTR, CDC13 _{DBD} -hTERT	TLC1WT, EST2	death 70~90	hTR, CDC13 _{DBD} -hTERT	TLC1h, EST2	death < 20

TABLE 1. Summary of complementation assays. BY4705 cells carrying deletions of *TLC1* and *EST2* were transformed with yeast telomerase plasmids pTLC1(h)TRP/pEST2-LYS2) in order to maintain survival. After sporulation, cells were transformed with plasmids carrying human telomerase subunit genes (pRS422-hTR/pEGKT-hTERT or p426/CDC13_{DBD}-hTERT). Complementation of yeast telomerase subunits by the corresponding human subunits can be assessed after loss of different plasmids followed by assessing survival of cells after restreaking on selective media. The left panel summarizes the results obtained with strains harbouring pTLC1TRP (wt *TLC1*); the right panel summarizes the results obtained with the starting strain harbouring pTLC1hTRP (*Tlc1h*). Expression of human telomerase subunit genes was induced by growth on galactose containing media.

Figure 1

Bah et al. 2003

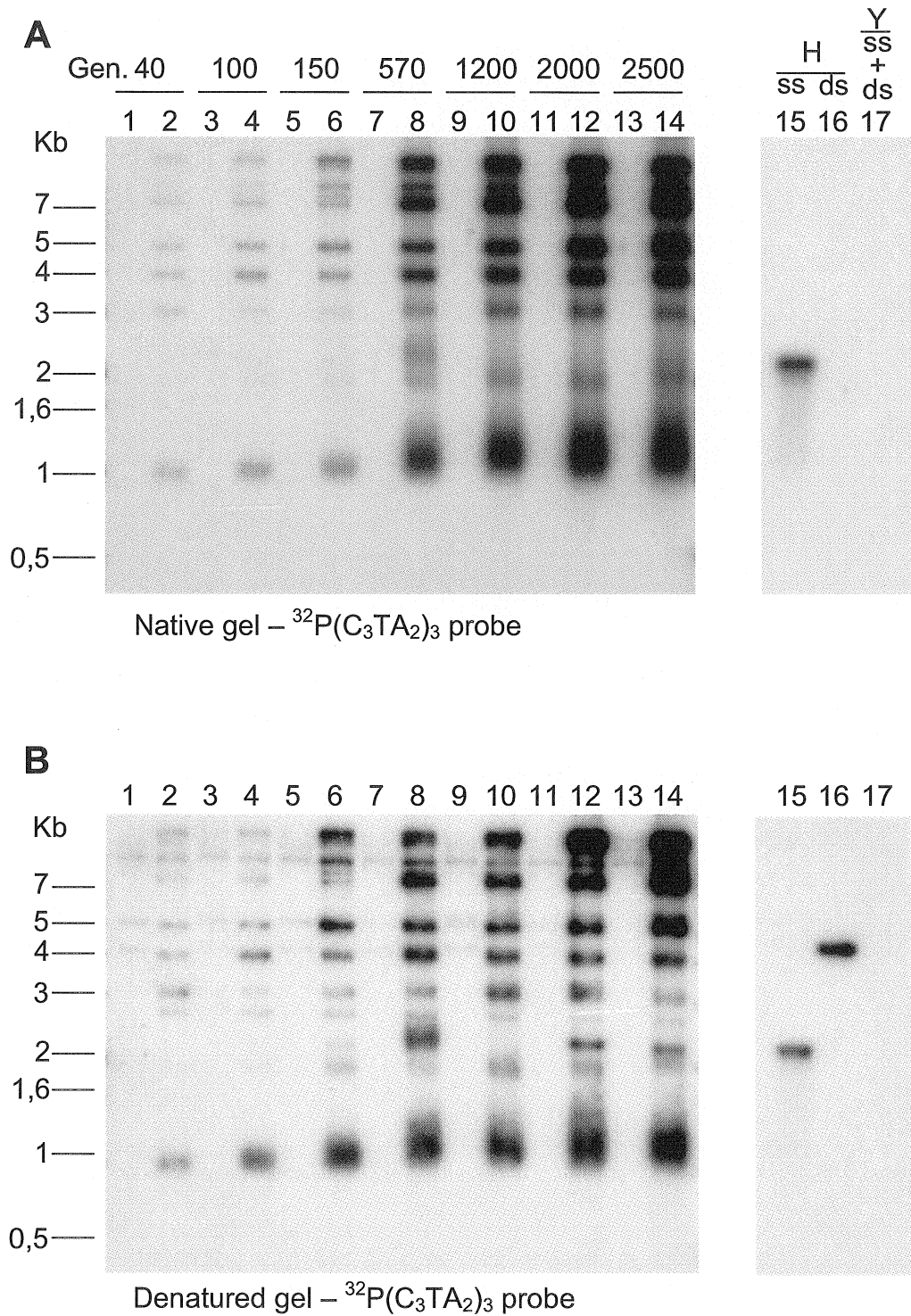


Figure 1 (ctd)

Bah et al. 2003

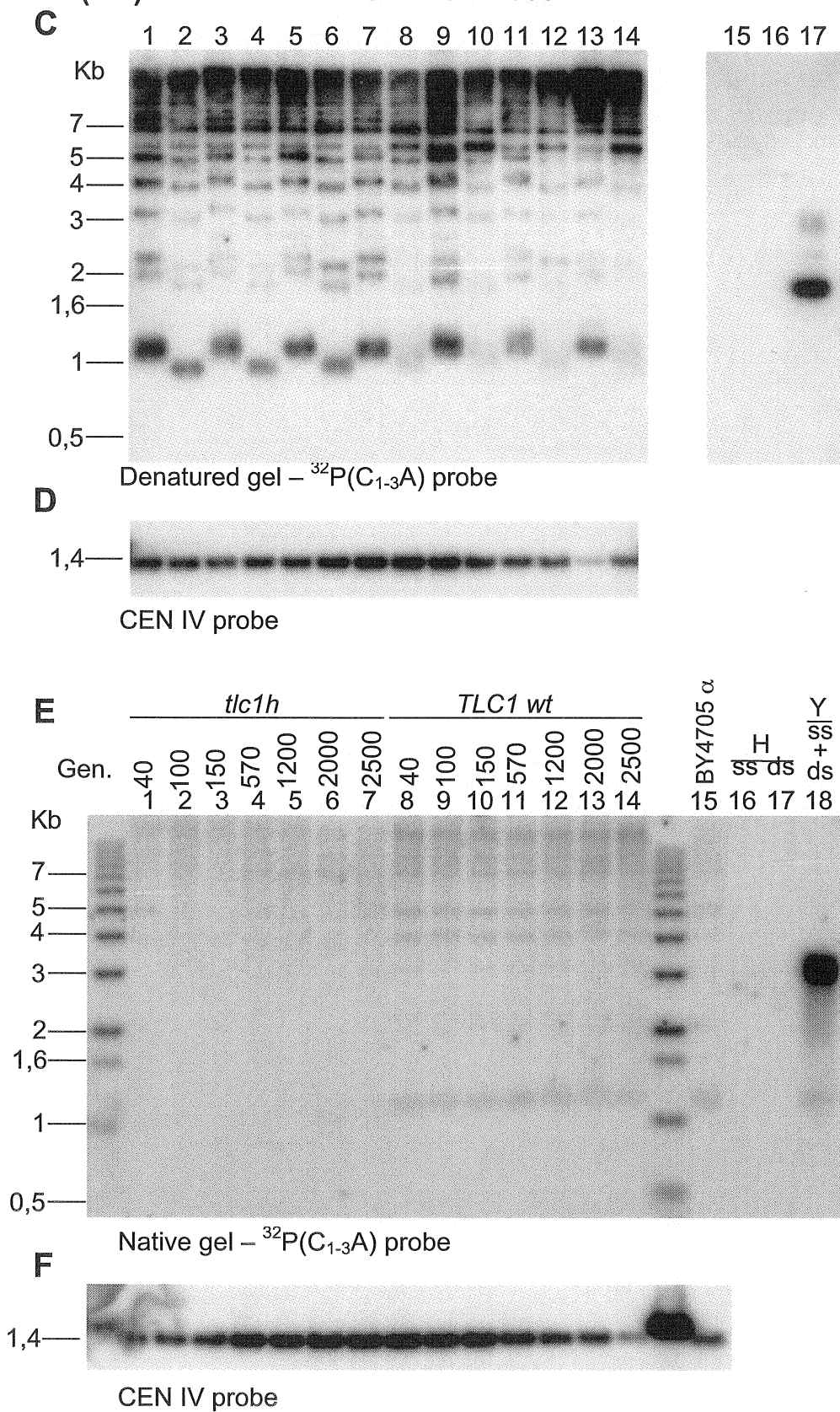


Figure 2

Bah et al. 2003

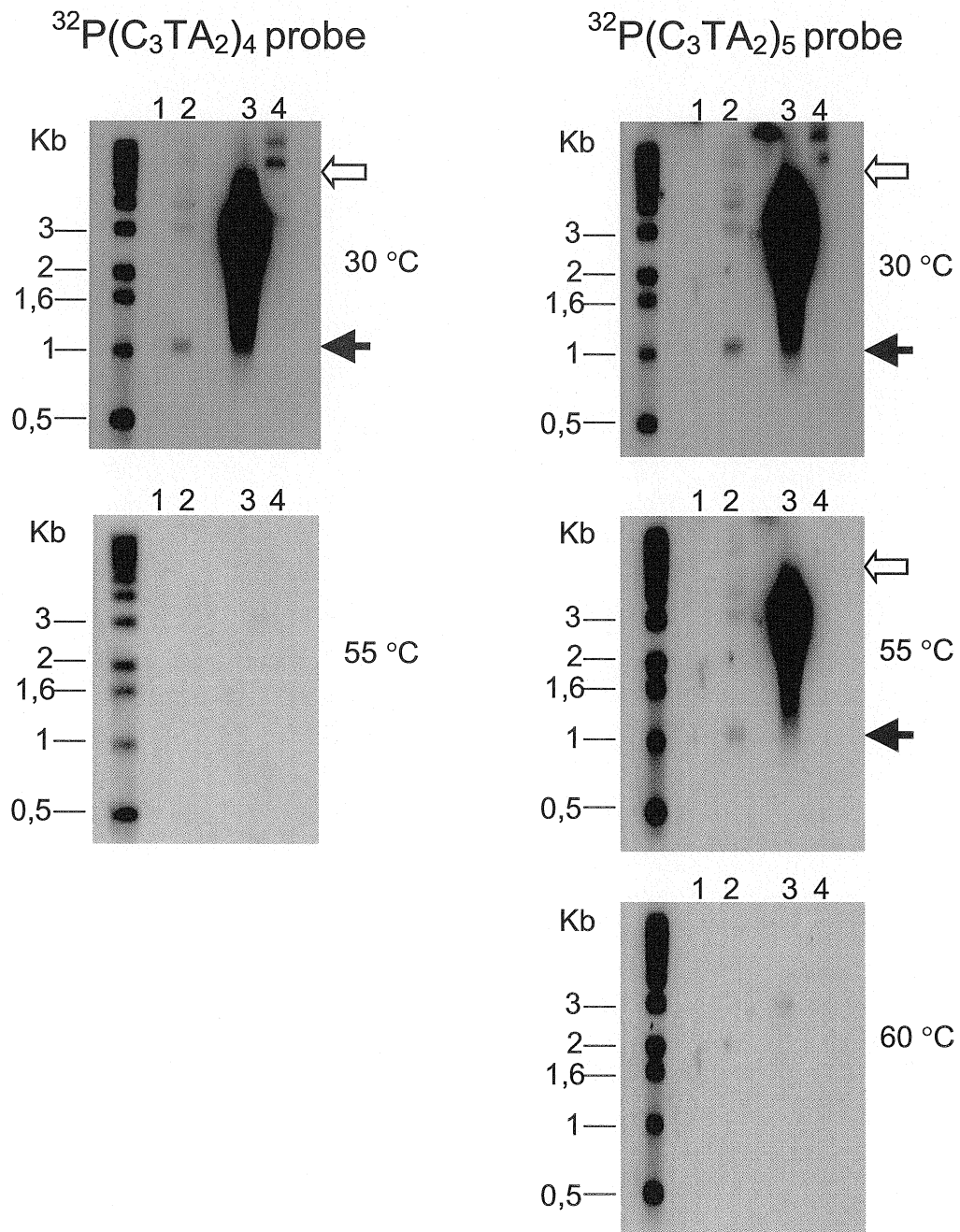


Figure 3

Bah et al. 2003

A

number of generations	TG ₁₋₃ (nt) only telomeres	TG ₁₋₃ (nt) + T ₂ AG ₃ (nt) telomeres		telomere length (nt)
40G	171 ± 13 (6/9)	129 ± 38	40 ± 5	169 ± 39 (3/9)
100G	96 ± 15 (5/14)	103 ± 14	43 ± 29	146 ± 26 (9/14)
150G	71 ± 14 (4/10)	90 ± 3	57 ± 29	147 ± 28 (6/10)
570G	0 (0/7)	87 ± 6	45 ± 31	131 ± 29 (7/7)
1200G	0 (0/7)	59 ± 5	124 ± 19	182 ± 22 (7/7)
2500G	0 (0/10)	48 ± 2	128 ± 36	175 ± 36 (10/10)

B

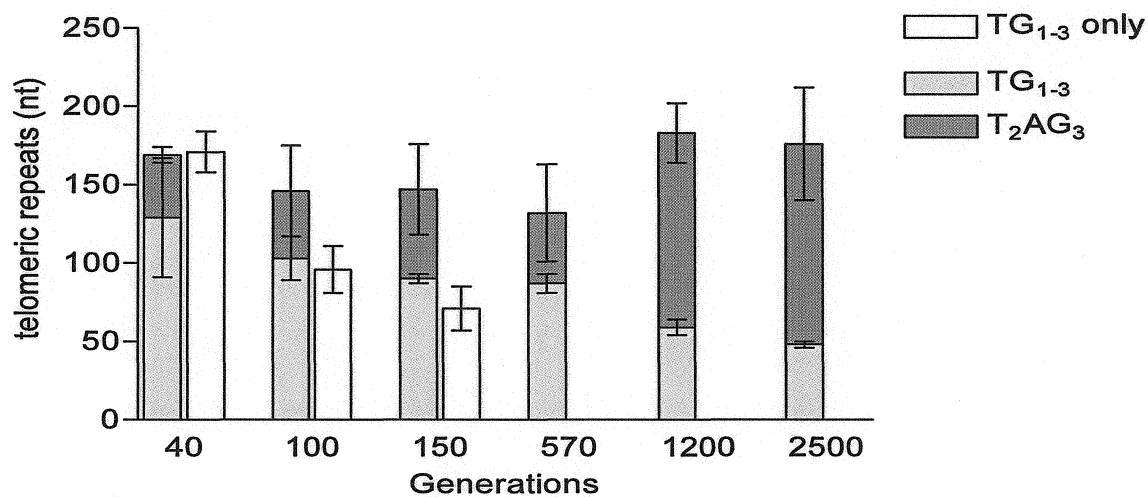


Figure 4

Bah et al. 2003

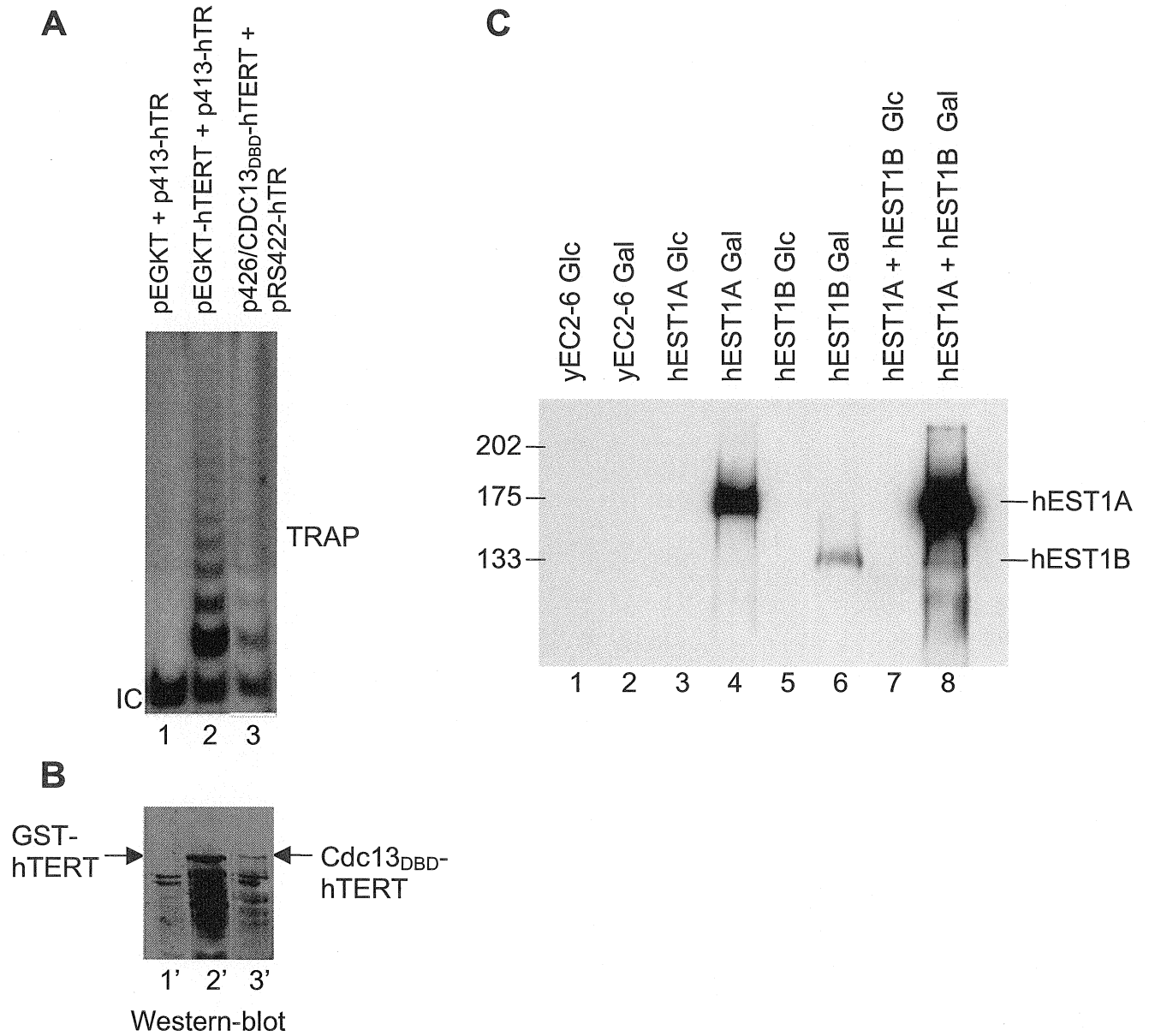
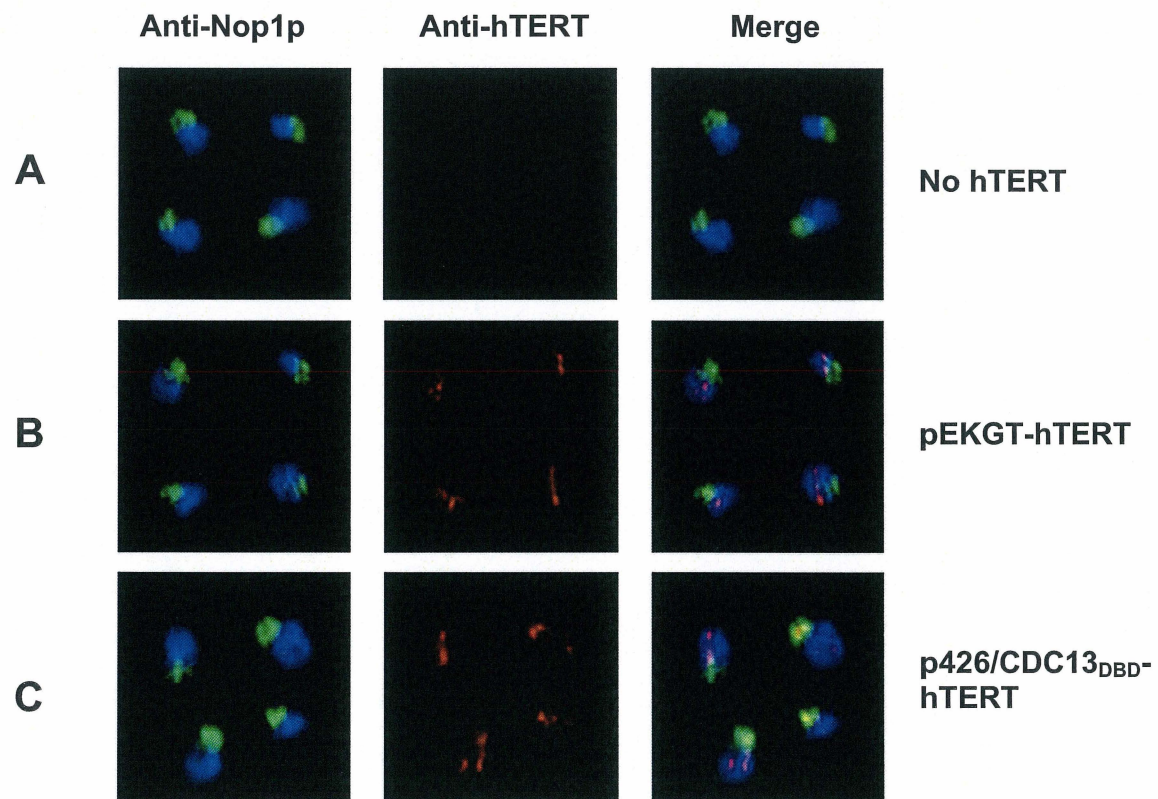


Figure 5

Bah et al. 2003



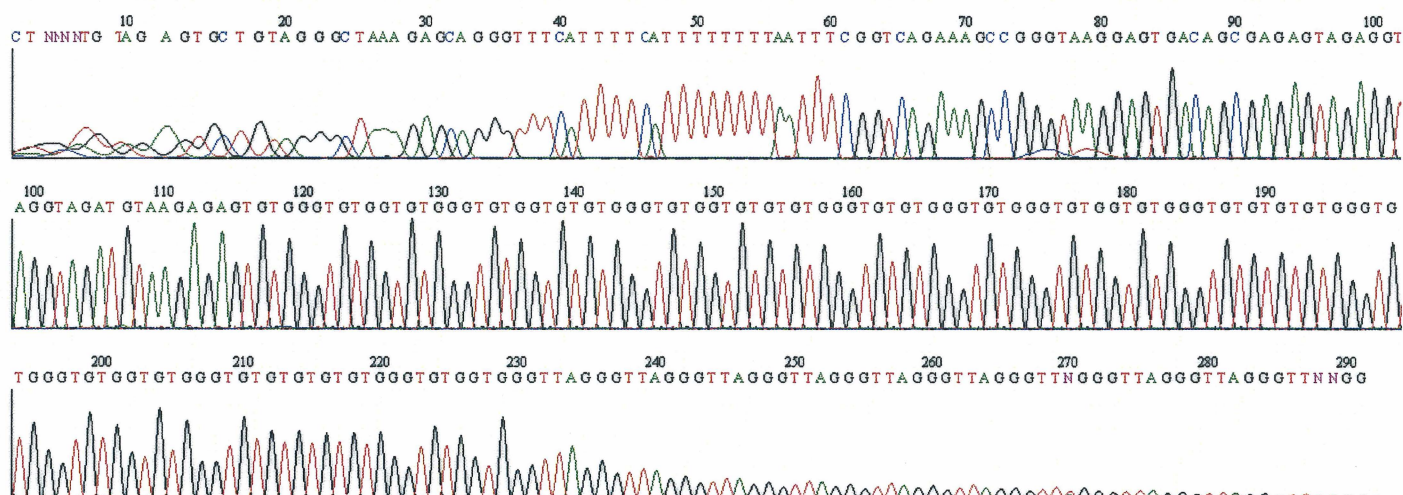
ANNEXE 2

Chromatogrammes des résultats de séquençage de fusions télomère-télomère de la figure 21.

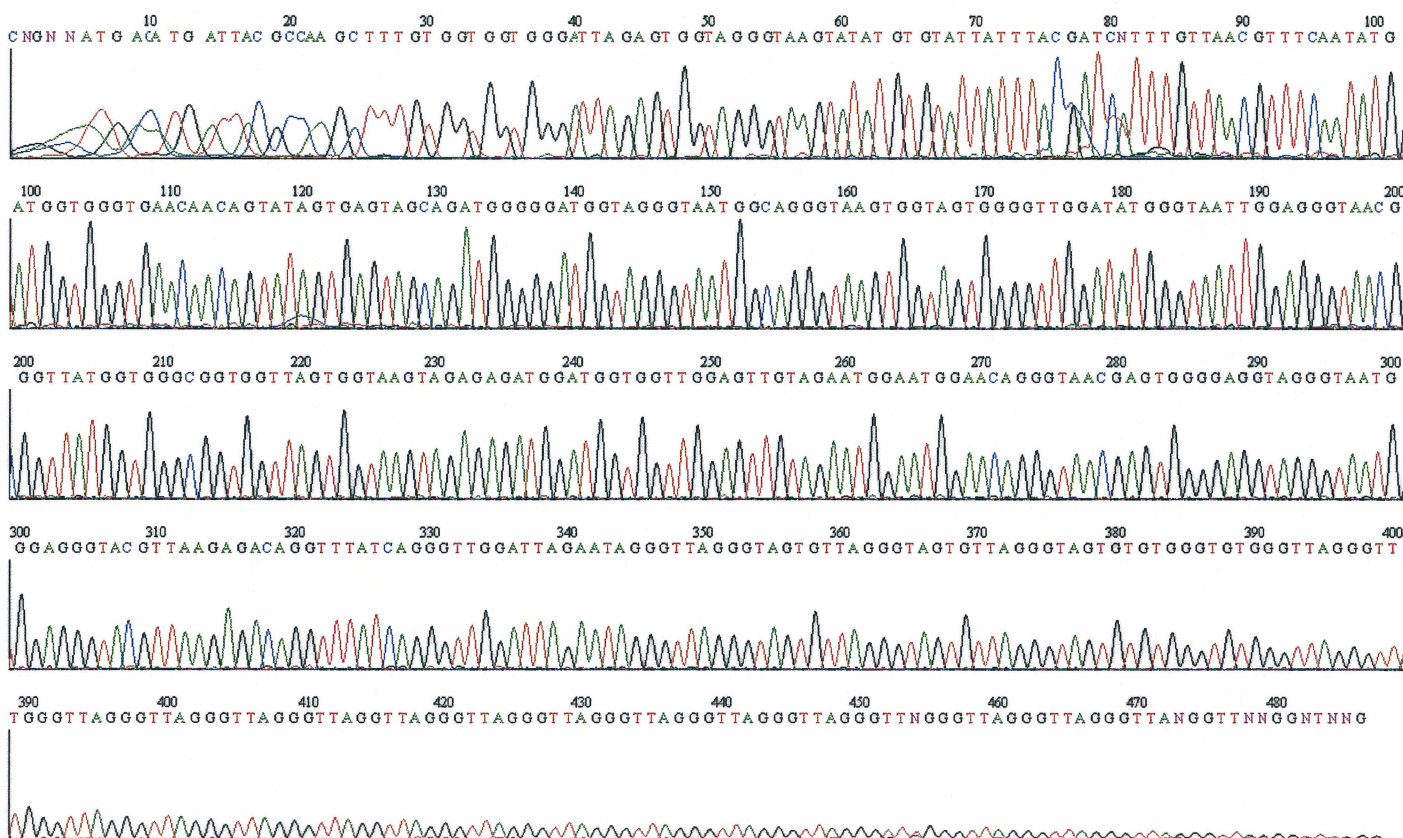
ANNEXE 2

T-T HY 2000G

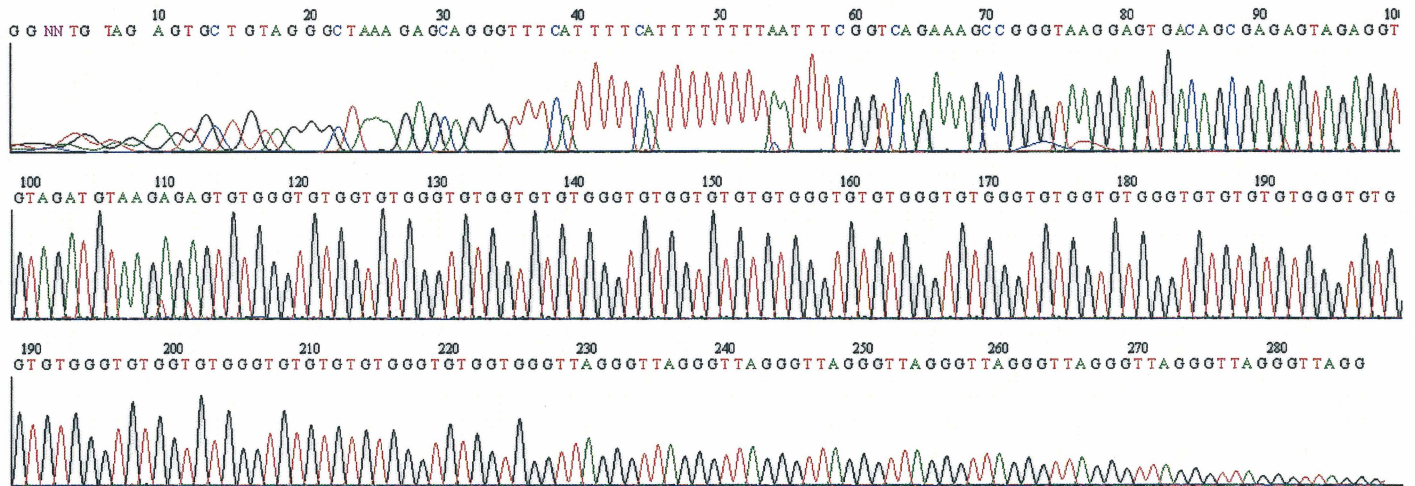
M13F primer (Y' telomere)



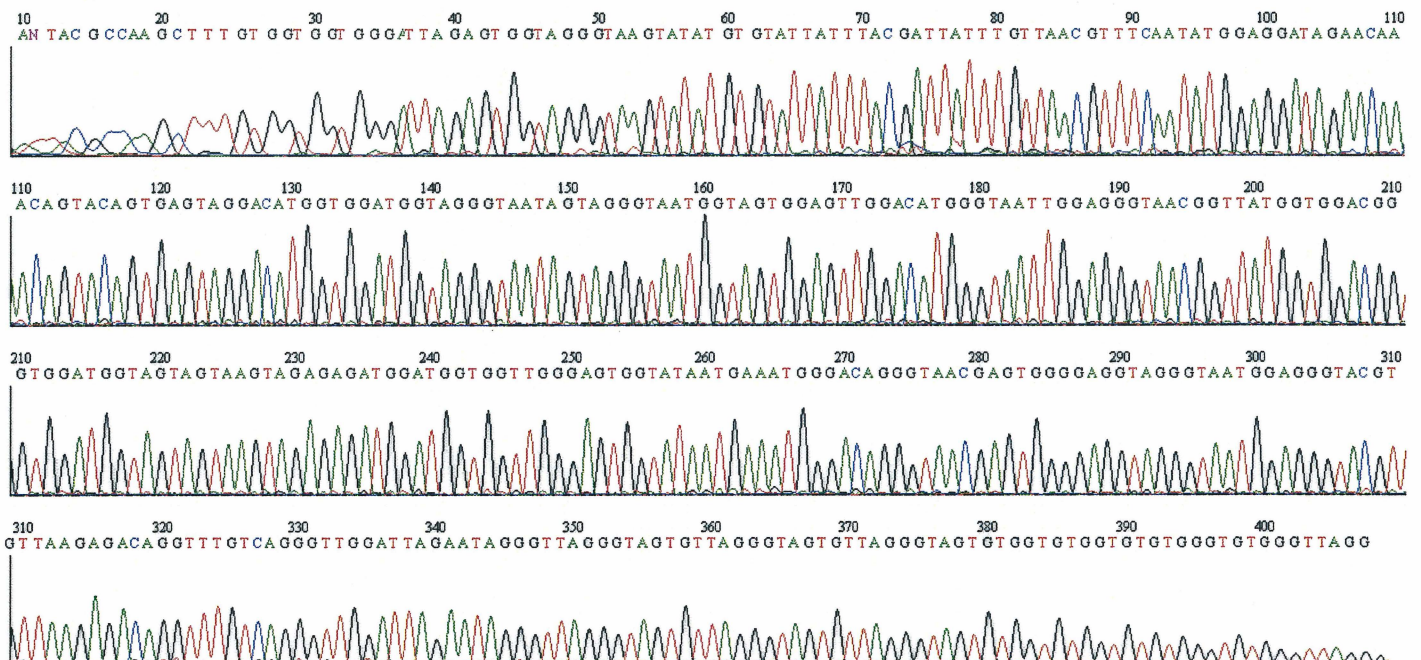
M13R primer (X telomere)



M13F primer (Y' telomere)



M13R primer (X telomere)



ANNEXE 3

Carte de la fin des chromosomes chez *Saccharomyces cerevisiae*.

170

